

**Bedeutung von Sekundärmutationen in der
Rezeptortyrosinkinasedomäne von KIT bei der
Resistenzentwicklung gastrointestinaler Stromatumoren
unter Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Nadja Thomas
aus Bad Homburg v. d. Höhe
2018

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Eva Wardelmann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch

Tag der Mündlichen Prüfung: 27. April 2018

Aus dem Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. G. Kristiansen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Epidemiologie.....	7
1.2	Pathogenese	7
1.3	Diagnostik	9
1.3.1	Klinik.....	9
1.3.2	Klinische Diagnostik	9
1.3.3	Makroskopische und mikroskopische Charakteristika	10
1.3.4	Immunhistochemische Charakteristika.....	10
1.4	Molekularpathologie bei GIST	11
1.4.1	Der KIT–Rezeptor (CD117).....	11
1.5	Mutationsspektrum von <i>KIT</i> bei GIST.....	15
1.6	Dignität.....	17
1.7	Klinischer Verlauf	18
1.8	Therapie	18
1.8.1	Chirurgische Therapie	18
1.8.2	Medikamentöse Therapie	19
1.9	Resistenzentwicklung unter Therapie mit Imatinib	21
1.9.1	Primäre Resistenz.....	21
1.9.2	Sekundäre Resistenz	21
1.10	Fragestellung	22
2.	Material und Methoden.....	23
2.1	Patientenkollektive	23
2.2	Molekularbiologie	23
2.2.1	Liste der Materialien	23
2.2.1.1	Lösungen, Puffer und Medien	23
2.2.1.2	Kits	23
2.2.1.3	Primer.....	24
2.2.1.4	Restriktionsendonukleasen	25
2.2.1.5	Geräte	25

2.2.2	Polymerase – Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.3	Agarosegelelektrophorese	26
2.2.4	DNA – Extraktion aus dem Agarosegel	26
2.2.5	Bidirektionale Sequenzierung.....	27
2.3	In vitro Mutagenese der 3 neugefundenen Sekundärmutationen	28
2.3.1	Mutagenese – PCR.....	28
2.3.2	Agarosegelelektrophorese	28
2.3.3	Aufreinigung der DNA mittels QIAquick spin column.....	29
2.3.4	Verdau der Wildtyp – DNA mittels DpnI.....	29
2.3.5	Transformation via Hitzeschock	29
2.3.6	Minipräparation von Plasmid – DNA.....	30
2.3.7	Phenol – Chloroform Extraktion	30
2.3.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung	31
2.3.9	DNA – Restriktion mit NotI.....	31
2.3.10	Bidirektionale Sequenzierung.....	31
2.3.11	Retransformation in XL1 – Blue	32
2.3.12	Maxipräparation von Plasmid – DNA.....	32
2.3.13	Klonierung in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1	33
2.3.14	Ethanolfällung	33
2.3.15	Verdau mit Asp718 und PvuI	34
2.3.16	Vorbereitung von pcDNA3.1 mittels Verdau mit NotI und Asp718	34
2.3.17	Dephosphorylierung von DNA – Fragmenten.....	35
2.3.18	Ligation.....	35
2.3.19	Analytischer Verdau mit PstI und ApaI	35
3.	Ergebnisse	37
3.1	Klinisch – pathologische Parameter	37
3.1.1	Alter und Geschlecht.....	38
3.1.2	Lokalisation des Primärtumors	38
3.1.3	Histologische Charakteristika der Primärtumoren	40
3.1.4	Größe des Primärtumors.....	40

3.1.5	Dignität.....	41
3.1.6	Molekulare Diagnostik bezüglich der Primärmutation.....	42
3.1.7	Klinischer Verlauf	44
3.1.8	Ansprechen auf Imatinib, Follow – up und Outcome.....	45
3.2	Nachweis von Mutationen in <i>KIT</i> Exon 14 und 15.....	47
3.2.1	Nachweis einer Sekundärmutation in <i>KIT</i> Exon 14 bei 2 Patienten unter Therapie mit Imatinib.....	47
3.3	Sekundärmutationen in Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib und Gruppe WT – Patienten mit einem Wildtyp-GIST	48
3.4	In – Vitro – Mutagenese	49
4.	Diskussion.....	50
4.1	Nachweis einer bisher nicht beschriebenen Sekundärmutation.....	50
4.1.1	Sekundärmutation p.T670E als möglicher Resistenzmechanismus.....	50
4.2	Häufigkeit von Sekundärmutationen bei GIST	51
4.3	Lokalisation der Sekundärmutationen	52
4.4	Vorkommen von Sekundärmutationen in bestimmten Subtypen	52
4.5	Unterschiede dieses Patientenkollektives im Vergleich zu den Daten der Literatur.....	53
4.6	Nachweis der Sekundärmutationen nur in einzelnen Proben.....	53
4.7	Mutationstyp.....	54
4.8	Polyklonale Sekundärmutationen.....	54
4.9	Entstehen die Sekundärmutationen neu oder wächst der Tumor aufgrund einer Selektion durch die Therapie?.....	56
4.10	Einfluss der Sekundärmutationen auf den klinischen Verlauf.....	57
4.11	Alternative Resistenzmechanismen	57
4.12	Alternative Therapiemöglichkeiten	58
5.	Zusammenfassung.....	61
6.	Anhang.....	62
6.1	Klinische Daten	62
6.2	Vektorkarten	71

7.	Literaturverzeichnis	74
8.	Danksagung	85

1. Einleitung

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sind die häufigsten mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltrakts, ihre Histologie und Terminologie wurde jedoch lange kontrovers diskutiert. Mit 0,1 – 3 % aller gastrointestinalen Neoplasien handelt es sich um relativ seltene Tumoren (Singer et al., 2002). Corless beschrieb 2014 eine Inzidenz von 11 – 19,6 auf 1 Million Einwohner/Jahr weltweit. Die überwiegende Mehrzahl der GIST exprimiert KIT, eine membranständige Rezeptortyrosinkinase Typ III. Ca. 70 bis 80 % der sporadisch auftretenden GIST tragen eine aktivierende Mutation in dem Protoonkogen *KIT*, 5 bis 15 % in dem Protoonkogen *PDGFRA*. Bei den restlichen ca. 10 bis 15 % handelt es sich um so genannte Wildtyp-GIST, bei denen andere Mechanismen zu Grunde liegen oder die molekulare Ursache noch unklar ist (Heinrich et al., 2008; Hirota et al., 1998; Huss et al., 2013).

1.1 Epidemiologie

Am häufigsten treten GIST ab dem 50. Lebensjahr auf, Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. 50 – 60 % aller GIST entstehen im Magen, 20 – 30 % im Dünndarm, davon ca. 4 – 5 % im Duodenum. Seltene Primärlokalisationen sind das Rektum (4 %), das übrige Kolon (1 – 2 %), und der Ösophagus (unterschiedliche Angaben in der Literatur bis maximal 5 %). Sehr selten sind GIST in extraintestinalen Lokalisationen wie Mesenterium, Omentum und Retroperitoneum beschrieben, Einzelfallbeschreibungen gibt es von der Gallen- und Harnblase (Fletcher et al., 2002). Miettinen et al. geben 2006 die Gesamtinzidenz extraintestinaler Primärlokalisationen mit weniger als 5 % an. Als seltene Sonderfälle kommen kindliche und familiär auftretende Fälle vor. Gefunden werden diese fast ausschließlich im Magen, histologisch gehören sie zumeist dem epitheloidzelligen Typ an. Bei Kindern unter 18 Jahren scheint es eine Häufung beim weiblichen Geschlecht zu geben (Li et al., 2005; Miettinen et al., 2005a).

1.2 Pathogenese

Aufgrund der übereinstimmenden Expression von CD117 und CD34 sowohl in der Mehrzahl der gastrointestinalen Stromatumoren als auch in den interstitiellen Cajal'schen Zellen in der Wand des Gastrointestinaltrakts geht man davon aus, dass GIST von den Cajal'schen Zellen oder deren Vorläuferzellen ausgehen. Cajal'sche Zellen sind die Schrittmacherzellen des Gastrointestinaltrakts, sie kontrollieren bzw. initiieren die Motilität

des Magen-Darm-Trakts (Hirota et al., 1998). Cajal'sche Zellen stammen von intestinalen mesenchymalen Vorläuferzellen ab und es wird vermutet, dass die Expression von CD117 für die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Cajal'schen Zellen notwendig ist (De Silva und Reid, 2003). CD 117 ist ein Synonym für die Tyrosinkinase KIT. Eine Mutation in *KIT*, die eine Aktivierung der Tyrosinkinase ohne Bindung des Liganden bewirkt, kann ein ungehindertes Zellwachstum und somit die Entstehung eines GIST erklären. Eine solche aktivierende Mutation in dem Proto-onkogen *KIT* wird in bis zu 70 bis 80 % der sporadisch auftretenden GIST gefunden (Hirota et al., 1998). Eine Mutation in der KIT verwandten Tyrosinkinase *PDGFRA* findet sich in weiteren 5 bis 15 % (Heinrich et al., 2008; Hirota et al., 1998; Huss et al., 2013; Miettinen und Lasota, 2013). In einer kleinen Zahl von Fällen treten GIST familiär gehäuft auf. Bislang konnten über 30 Familien weltweit identifiziert werden, die eine Keimbahnmutation im *KIT*-Gen tragen (Jones et al., 2015). Bei einer Subgruppe von diesen treten neben GIST auch Hyperpigmentierungen und systemische Mastozytosen auf (Beghini et al., 2001; Isozaki et al., 2000; Kleinbaum et al., 2008). GIST ohne nach-zuweisende *KIT*- oder *PDGFRA*-Mutation wurden in den vergangenen Jahren auch als Wildtyp-GIST bezeichnet. Durch die weitere Aufklärung unterschiedlicher pathogenetischer Mechanismen ihrer Entstehung wird diese Bezeichnung zunehmend kontrovers diskutiert. Eine sinnvolle Unterteilung dieser Gruppe erfolgt heute in Tumoren mit und solche ohne Succinatdehydrogenase-Defizienz (SDH-Defizienz). Bei der SDH-Defizienz fällt einer der vier Bestandteile (SDHA, -B, -C, oder -D) des Succinatdehydrogenase-Komplexes durch Mutation oder epigenetisches Silencing aus, und es kommt zu einer intrazellulären Akkumulation von Succinat. 2011 beschrieben Janeway et al. Mutationen in der Untereinheit B, C oder D der Succinatdehydrogenase bei zumeist jungen Patienten mit multiplen mit Paragangliomen assoziierten GIST. SDH-Mutationen können sowohl in der Keimbahn als auch somatisch vorkommen. Bei erstgenannter Situation entwickeln die zumeist jungen Patienten mit Keimbahnmutation im SDH-Komplex neben GIST auch Paragangliome, dieses Krankheitsbild wird Carney-Stratakis-Syndrom genannt. Bei zweitgenannter Konstellation mit somatischer SDH-Mutation treten neben GIST pulmonale Chondrome auf, es handelt sich um die Carney-Triade (Carney und Stratakis, 2002; Pasini et al., 2008; Zhang et al., 2010). Miettinen et al. beschrieben 2011, dass aus ihrem Patientenkollektiv bei etwa 7,5 % der nicht klassifizierten GIST eine ursächliche Fehlfunktion der Succinatdehydrogenase gefunden werden konnte. Ein Teil

der SDH-negativen GIST lässt sich keinem dieser Syndrome zuordnen, die Genese dieser Tumoren ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. In mehreren Studien konnte bei Wildtyp-GIST, sowohl bei solchen mit als auch bei solchen ohne SDH-Defizienz, eine Überexpression des IGF1-Rezeptors nachgewiesen werden. Bei SDH-defizienten GIST kann dies auf eine Hochregulation der Transkription von *IGF1* in Folge einer Akkumulation von Succinat zurückgeführt werden, bei Wildtyp-GIST mit intakter Succinatdehydrogenase könnten anderweitige Störungen im mitochondrialen Stoffwechsel ursächlich sein (Beadling et al., 2013; Belinsky et al., 2013; Braconi et al., 2008; Corless 2014). Der IGF1-Rezeptor nimmt, ebenso wie KIT, über die MAP- und PI3Kinase/ AKT-Signalkaskade Einfluss auf die Zellproliferation (Nannini et al., 2013). Eine weitere familiäre Prädisposition stellt die Neurofibromatose Typ 1 dar, bei der der SDH-Komplex intakt ist. Patienten mit einer Neurofibromatose Typ I haben ein gegenüber der Normalbevölkerung ca. 200fach erhöhtes Risiko, einen GIST zu entwickeln. Diese GIST treten meist multipel im Bereich des Dünndarms auf (Andersson et al., 2005; Miettinen und Lasota, 2006; Miettinen und Lasota, 2011). Corless geht 2014 davon aus, dass etwa 7 % der Patienten mit Neurofibromatose einen GIST entwickeln. Neben den bisher beschriebenen Pathomechanismen wurden in einigen GIST Mutationen im BRAF-Gen, das für eine Serin/Threonin Kinase kodiert und als Protoonkogen unter anderem des malignen Melanoms bekannt ist, gefunden. *BRAF*-mutierte GIST scheinen vor allem im Dünndarm aufzutreten (Agaimy et al., 2009; Agaram et al., 2008).

1.3 Diagnostik

1.3.1 Klinik

GIST verursachen keine charakteristischen klinischen Zeichen. Die Symptomatik ist abhängig von Lokalisation und Größe des Tumors. Zumeist stehen uncharakteristische Oberbauchbeschwerden, Schmerzen und Übelkeit im Vordergrund, aber auch Obstipation, Ileus oder gastrointestinale Blutungen kommen vor (Corless 2014; Frankel et al., 2011). Wie bei anderen konsumierenden Erkrankungen kann auch eine B-Symptomatik einen Hinweis auf einen GIST geben.

1.3.2 Klinische Diagnostik

Da es bislang keine GIST-spezifischen Biomarker im Blut gibt, erfolgt die Diagnosestellung mittels gastrointestinaler Bildgebung (seltener sonographisch, häufiger CT, MRT,

PET-CT), endoskopisch beziehungsweise endosonographisch oder im Rahmen laparoskopischer oder offener chirurgischer Interventionen. Ca. 30 % der GIST werden als Zufallsbefund diagnostiziert. Van der Noot et al. beschrieben 2004 eine präoperative Diagnosestellung via endoskopischer Biopsie in ca. 20 – 30 % der Fälle, eine endosonographisch gesteuerte Feinnadelpunktion hatte eine Erfolgsrate bis 76 %. 2011 veröffentlichen De Witt et al. eine erfolgreiche Diagnosestellung bei über 90 % der Fälle durch eine endosonographisch gesteuerte Biopsie.

1.3.3 Makroskopische und mikroskopische Charakteristika

Makroskopisch stellen sich GIST meist als gut abgrenzbare Tumoren mit fibroider oder muskelartiger Schnittfläche mit Ausgang von der Muscularis propria dar. Größere Läsionen weisen häufig eine zystische Degeneration oder zentrale Nekrose auf. Ulzerationen der benachbarten Mukosa können vorkommen (De Silva und Reid, 2003). Histologisch werden GIST in 3 Kategorien unterteilt (Fletcher et al., 2002). Etwa 70 % der GIST gehören zum spindelzelligen Subtyp, 10 % zum epitheloidzelligen Subtyp, der nach de Silva und Reid, 2003 und Fletcher et al., 2002 häufig im Magen lokalisiert ist. Beim gemischten Subtyp, der 3. Kategorie, in etwa 20 % beobachtet, existieren beide Formen nebeneinander oder der Zelltyp ist intermediär.

1.3.4 Immunhistochemische Charakteristika

90 – 95 % der gastrointestinalen Stromatumoren exprimieren unabhängig von ihrer Primärlokalisierung, ihrem histologischen Erscheinungsbild und ihrem biologischen Verhalten den Marker CD117, synonym KIT-Rezeptor (González-Cámpora et al., 2011). Dabei ist bei den meisten GIST KIT in über 90 % der Tumorzellen nachweisbar, während nur eine Minderheit KIT fokal nur in 5 – 20 % der Tumorzellen exprimiert (Fletcher et al., 2002). Ein weiterer GIST-spezifischer Marker wurde 2004 von West et al. beschrieben. DOG1 („Discovered on GIST 1“), auch bekannt unter dem Namen Anoctamin 1 (ANO1), ist ein Calcium reguliertes Chloridkanalprotein, das, wie auch der KIT-Rezeptor, in den Cajal'schen Zellen exprimiert wird und daher auch bei KIT-negativen GIST zur Diagnosestellung herangezogen werden kann. Das Gen für DOG1 liegt auf Chromosom 11q13. Liegl et al. bestätigten 2009 DOG1 als sehr sensitiven immunhistochemischen Marker, in ihrer Untersuchung konnten 36 % der KIT-negativen GIST mittels DOG1 diagnostiziert werden. Aktuell geht man davon aus, dass etwa 97 % der GIST positiv für

DOG1 sind, negativ sind vereinzelt GIST des Dünndarms. KIT und DOG1 zusammen können fast 100 % der GIST diagnostizieren, da sich ihre „shadow areas“ unterscheiden (Miettinen et al., 2009).

Von GIST abzugrenzen sind anderweitige vor allem mesenchymale Tumoren mit anderem immunhistochemischen Expressionsprofil, wie z.B. Leiomyome, Leiomyosarkome, Schwannome, dedifferenzierte Liposarkome, aber auch atypisch wachsende Karzinome, neuroendokrine Tumoren oder Lymphome (Miettinen et al., 2011).

1.4 Molekularpathologie bei GIST

1.4.1 Der KIT-Rezeptor (CD117)

Die Tyrosinkinase KIT (Synonym CD117) ist eine membranständige Rezeptor-Tyrosinkinase. Codiert wird KIT von dem etwa 70 Kilobasen umfassenden Protoonkogen *KIT* auf dem langen Arm des Chromosoms 4 (4q11 21) (D' Auriol et al., 1988). Das Gen besteht aus 21 Exons mit einer Länge zwischen 92 – 383 Basenpaaren. Der Rezeptor hat ein Molekulargewicht von 145 Kilodalton und besteht aus 5230 Basenpaaren, die für 976 Aminosäuren kodieren. Wie alle membranständigen Tyrosinkinasen besteht KIT aus 3 Untereinheiten:

Einer aus 5 Schleifen bestehenden extrazellulären Domäne, an die der Ligand bindet und die die Dimerisation und die Proteolyse des Proteins reguliert. Zudem aus einer transmembranären Domäne, die das Protein in der Zellmembran verankert und an die sich eine juxtamembranäre Domäne anschließt, die eine autoinhibitorische Funktion besitzt. Des weiteren aus einer intrazellulären Domäne, der eigentlichen Tyrosinkinase, bestehend aus einer Domäne mit einer ATP-Bindungsstelle und einer zweiten mit einer Phosphotransferase-Region, die Ausgangspunkt weiterer intrazellulärer Signalkaskaden zur Kontrolle der Zellproliferation, -adhäsion und -differenzierung ist (De Silva und Reid, 2003).

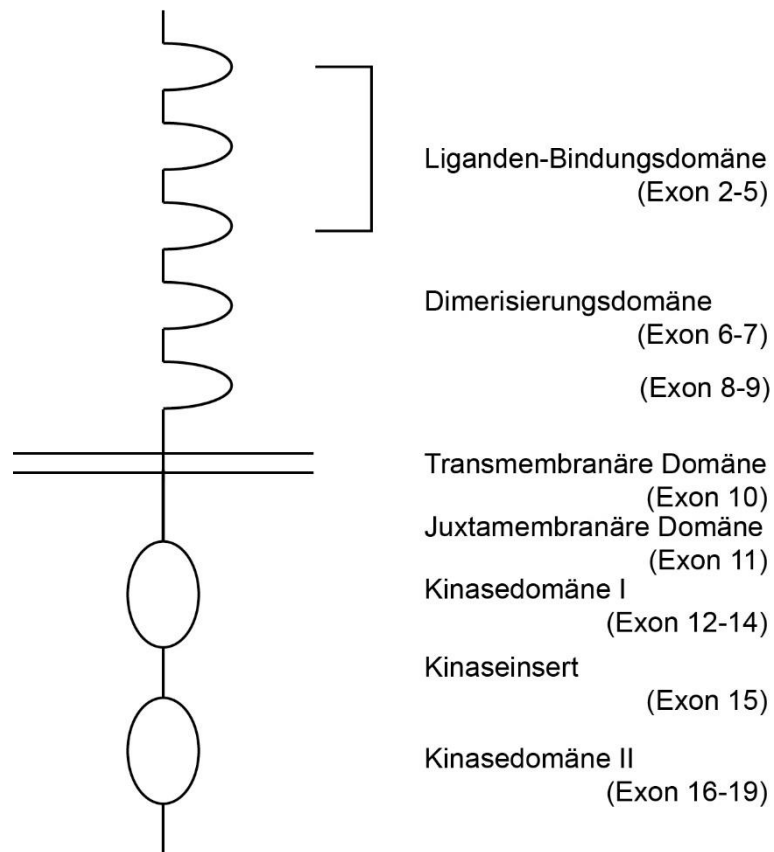


Abb. 1: Aufbau des KIT-Rezeptors mit den zugeordneten Exonen (Abbildung modifiziert nach Joensuu et al., 2002)

Als Ligand dient der Stammzellfaktor (Synonym *stem cell factor*, SCF, *steel factor*, *mast cell growth factor*, kit Ligand), dessen Bindung an den Rezeptor zu einer Dimerisation zweier nebeneinander liegender Rezeptorproteine führt. In der Folge kommt es zu einer Cross-Phosphorylierung der Tyrosinreste am jeweils anderen Rezeptor.

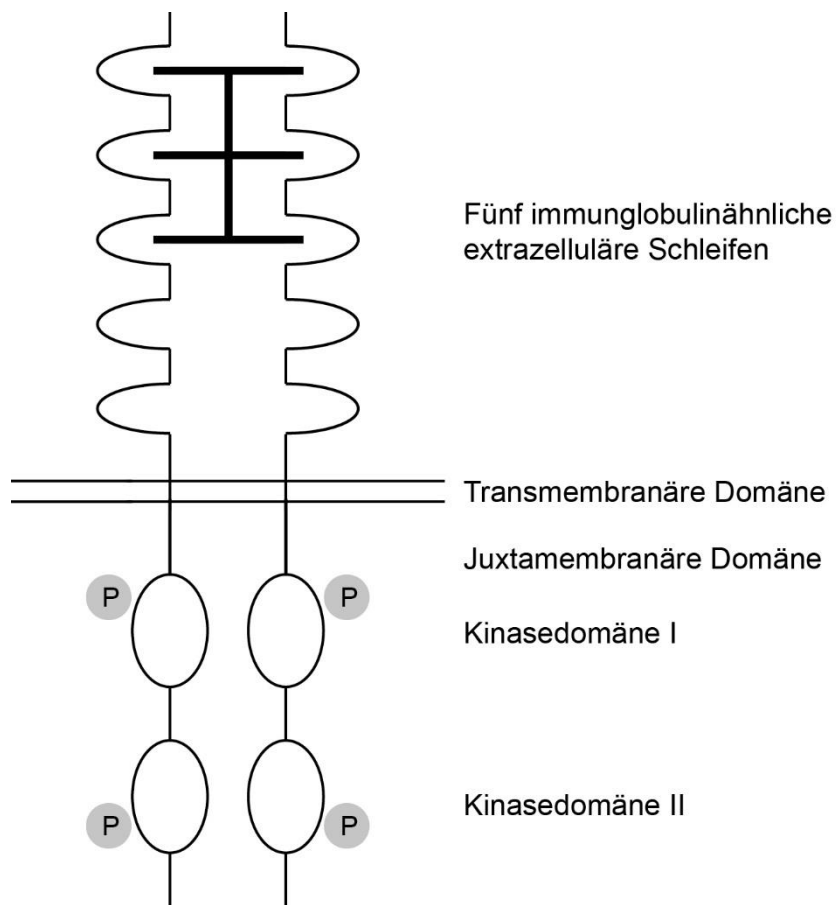


Abb. 2: Aktivierter c-KIT-Rezeptor mit gebundenem Liganden (Ξ) (Abbildung modifiziert nach Linda Gregory, biologische Diplomarbeit mit dem Titel „Resistenzmechanismen von gastrointestinalen Stromatumoren unter Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren“, vorgelegt im März 2006 in der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn).

Der phosphorylierte Rezeptor aktiviert wichtige intrazelluläre Signalwege wie z. B. den „mitogen activated protein kinase“ (MAP-Kinase) Weg, den JAK/STAT Weg sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die sämtlich die Zellproliferation sowie die Zellapoptose regulieren (Duensing et al., 2004).

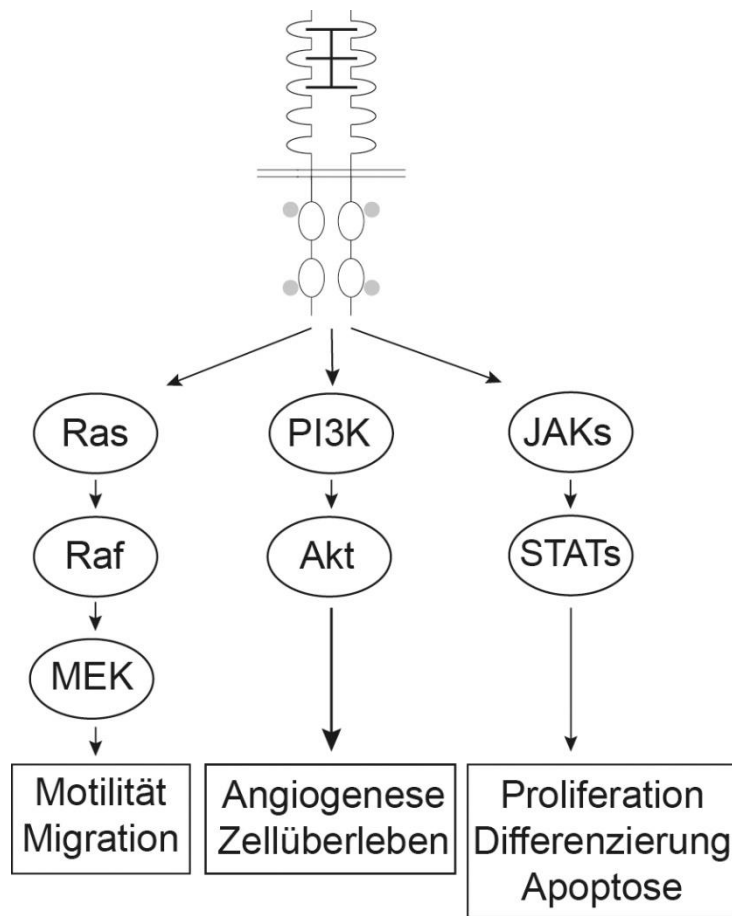


Abb. 3: Von KIT gesteuerte intrazelluläre Signalkaskaden (Abbildung modifiziert nach Liang et al., 2013 (1))

Physiologisch wird KIT in hämatopoetischen Vorläuferzellen, Mastzellen, Keimzellen, Zellen des Zentralen Nervensystems, Melanoblasten und Melanozyten, im Brustdrüsenepithel und den Cajal'schen Zellen exprimiert (Bokemeyer et al., 1996; Horie et al., 1993; Scheijen et al., 2002; Tian et al., 1999; Tsuura et al., 1994). Der KIT/SCF Signalweg scheint essentiell für die Entwicklung von Melanozyten, Erythrozyten, Keimzellen, Mastzellen und Cajal'schen Zellen zu sein (Hirota et al., 1998). Weitere Tumoren, die regelmäßig KIT exprimieren, gehen zumeist von den oben genannten Zellen aus, 2004 veröffentlichten Went et al. ihre Ergebnisse bezüglich der Prävalenz der KIT Expression aus 3000 Tumorproben von 120 Tumorentitäten, nachweisbar war KIT abgesehen von GIST in Seminomen (84 %), adenoidzystischen Karzinomen (65 %), malignen Melanomen (35 %) und Bronchialkarzinomen (17 %) sowie in Einzelfällen in weiteren Entitäten.

Bei manchen dieser Tumoren finden sich Mutationen in *KIT* an derselben Lokalisation wie bei GISTs (Huss et al., 2013). Im Falle von kleinzelligen Bronchialkarzinomen wird zwar *KIT* exprimiert (Krystal et al., 1996; Pietsch et al., 1998), hier konnten in mehreren Studien jedoch keine *KIT*-Mutationen nachgewiesen werden (Burger et al., 2003; Lu et al., 2012). Eine Expression von *KIT* bei Patienten mit systemischer Mastozytose beschrieben bereits Arber et al. 1998, Afrin et al. veröffentlichten im Juni 2015 eine erfolgreichen Therapie mit Sunitinib bei einer Patientin mit systemischer Mastozytose und *KIT* D816V Mutation. Inaktivierende Mutationen im *KIT*-Rezeptor wurden bei Patienten mit Piebaldismus, einer Pigmentierungsstörung mit weißer Stirnhaarsträhne und hypopigmentierten Hautarealen an Stamm und Extremitäten gefunden (López und Jordá 2011; Spritz et al., 1992). Schaltet man den SCF/*KIT* Signalweg bei Mäusen aus, so entwickeln diese eine Anämie, eine Infertilität, Pigmentierungsstörungen und eine gestörte Motilität im Gastrointestinaltrakt (Chabot et al., 1988).

1.5 Mutationsspektrum von *KIT* bei GIST

In der Mehrzahl der Fälle ist die Pathogenese eines GIST mit einer aktivierenden Mutation im *KIT*-Gen oder *PDGFRA*-Gen verbunden, diese treten jedoch nicht zufällig verteilt auf, sondern liegen zumeist in einer so genannten „Hot-Spot“ Region (*KIT* Exon 9, 11, 13, 17). Die Mutationen scheinen früh in der Pathogenese eines GIST aufzutreten, da sie bereits in Tumormaterial von Tumoren mit einem Durchmesser von kleiner 1 cm nachweisbar sind (Corless et al., 2002).

Manche Autoren berichten von einer Mutationsrate in *KIT* von über 90 % der GIST (Lasota und Miettinen, 2008), die Angaben schwanken jedoch erheblich, unter anderem wahrscheinlich aufgrund unterschiedlicher Detektionstechnik und der ethnischen Unterschiede in den verschiedenen Kollektiven. Aktuell geht man davon aus, dass ca. 80 % der GIST eine aktivierende Mutation im *KIT*-Gen aufweisen, am häufigsten betroffen ist Exon 11, gefolgt von Exon 9 (Corless, 2014; Miettinen und Lasota, 2011). Exon 11 kodiert die juxtamembranäre Domäne. Durch Mutationen wird wahrscheinlich die α -helikale Struktur verändert, so dass die autoinhibitorische Funktion verloren geht und eine ligandenunabhängige Aktivierung besteht (Hirota et al., 1998). Häufig sind Codon 557 und/oder Codon 558 deletiert (Debiec-Rychter et al., 2004). Tumoren mit Deletionen in dieser Region sind zumeist aggressiver als Tumoren mit Mutationen, die lediglich einen Austausch von Nukleotiden bewirken (Martin et al., 2005; Wardelmann et al., 2003), dies

scheint insbesondere für gastrale Tumoren zu gelten (Miettinen et al., 2005b). Mutationen, die zu einem Austausch einzelner Nukleotide in Exon 11 führen und somit mit einer eher günstigen Prognose einhergehen, beschränken sich in aller Regel auf Codon 557, 559, 560 und 576 (Lasota et al., 2003; Miettinen und Lasota, 2013). Insgesamt zeigen die häufigsten *KIT* Exon 11 Mutationen ein gutes Ansprechen auf Imatinib (Lasota und Miettinen, 2008).

Exon 9 kodiert die 5. extrazellulär gelegene immunglobulinähnliche Schleife. Aktuell geht man davon aus, dass ca. 10 % der GIST Mutationen in *KIT* Exon 9 aufweisen (Corless, 2014; Lux et al., 2000). Zumeist handelt es sich um eine 6 Basenpaarinsertion, die zu einer Duplikation von Codon Alanin-502 und Tyrosin-503 führt, andere Mutationstypen, z.B. Codon 506 betreffend, sind nur in Einzelfällen beschrieben (Hostein et al., 2006; Huss et al., 2013). Yuzawa et al. gehen davon aus, dass die Konformationsänderung, die sonst durch die Bindung des Liganden zustande kommt, durch die Mutation imitiert wird (Yuzawa et al., 2007). GIST mit *KIT* Exon 9 Mutationen kommen häufiger in Dünn- und Dickdarm vor, gastrale GIST haben hingegen nur selten eine Primärmutation in *KIT* Exon 9 (Antonescu et al., 2004; Huss et al., 2013). Aufgrund des schlechteren Ansprechens dieser Tumoren auf Imatinib in der Standarddosierung und der besseren Prognose unter erhöhter Imatinibdosierung wird bei GIST mit Mutationen in *KIT* Exon 9 die Imatinib-Standarddosierung von 400 mg/ Tag auf 800 mg/ Tag erhöht oder gegebenenfalls ein alternativer Tyrosinkinaseinhibitor wie z. B. Sunitinib verwendet (Debiec-Rychter et al., 2006; Marrari et al., 2010).

In seltenen Fällen (< 2 %) finden sich Mutationen in *KIT* Exon 13 (zumeist Codon 642), das die 1. Tyrosinkinase kodiert. Lasota et al. (2008) vermuten, dass die Mutation in der ATP-Bindungsstelle mit der normalen autoinhibitorischen Funktion der juxtamembranären Domäne interferiert.

Auch in *KIT* Exon 17, das die 2. Tyrosinkinasedomäne kodiert, werden ebenfalls in seltenen Fällen (ca. 1 %) Mutationen beschrieben. Exon 17-Mutationen führen zu einer Daueraktivierung der Kinasedomäne. Das Ansprechen auf Imatinib ist variabel (Corless, 2014; Lasota et al., 2008; Lux et al., 2000), recht häufig werden aber Resistenzen beobachtet, da Imatinib nur an die nicht aktivierte Konformation des KIT-Rezeptors binden kann.

KIT Exon 8 kodiert für die extrazelluläre Domäne. Nachdem 2005 von Hartmann et al. Mutationen in *KIT* Exon 8 als Keimbahnmutationen bei GIST und Mastozytose beschrieben wurden, wiesen Huss et al. 2013 *KIT* Exon 8 Mutationen bei sporadischen GIST (< 1 % der Fälle) nach.

1.6 Dignität

Die Dignitätsbeurteilung von gastrointestinalen Stromatumoren ist schwierig. Fletcher et al. teilten die Tumoren 2002 anhand der Tumorgroße und der Mitoserate in die Gruppen „high risk“, „intermediate risk“, „low risk“ und „very low risk“ ein. Unabhängig von der Größe des Primärtumors und der Mitosezahl scheinen GIST mit Primärlokalisation im Dünndarm eine schlechtere Prognose, die mit Primärlokalisation im Magen eine bessere Prognose zu haben (Emory et al., 1999; Miettinen und Lasota, 2001). GIST im Ösophagus sind außerordentlich selten (< 1 %) und aufgrund ihrer späten Diagnose-stellung meist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Miettinen und Lasota, 2011). Miettinen und Lasota entwickelten daher 2006 eine Klassifikation, die neben Proliferation und Größe auch die Primärlokalisation berücksichtigt. Diese später als AFIP-Klassifikation bezeichnete Einteilung ist heute die gängigste und am häufigsten verwendete.

Tab. 1: AFIP Klassifikation zur Dignitätsbeurteilung nach Miettinen und Lasota, 2006

Klasse	Größe [cm]	Mitoseanzahl pro 50 HPF	Risiko für Tumorprogress	
			Gastrale GIST	Dünndarm GIST
1	≤ 2	≤ 5	Sehr niedrig	Sehr niedrig
2	> 2 ≤ 5		Niedrig	Niedrig
3a	> 5 ≤ 10		Niedrig	Intermediär
3b	> 10		Intermediär	Hoch
4	≤ 2	> 5	Niedrig*	Hoch*
5	> 2 ≤ 5		Intermediär	Hoch
6a	> 5 ≤ 10		Hoch	Hoch
6b	> 10		Hoch	Hoch

HPF – high power field

* nicht ausreichend Fälle, um das Rückfallrisiko abschätzen zu können

Wie auch bei anderen Tumoren geht eine Metastasierung bei Diagnosestellung mit einer schlechteren Prognose einher. Eine Tumorruptur vor oder während der Operation führt durch das erhöhte Risiko einer peritonealen Metastasierung ebenfalls zu einer schlechteren Prognose (Joensuu, 2008; Hohenberger et al., 2010). Patienten mit Symptomatik bei Diagnosestellung scheinen eine schlechtere Prognose zu haben als Patienten, die initial klinisch unauffällig sind (Hassan et al., 2008). Gold et al. veröffentlichten 2009 ein Nomogramm, das die Prognose des progressfreien Intervalls abschätzen soll, Rossi et al. 2011 eines zum Abschätzen des Überlebens der Patienten. Da bei den bisherigen „klassischen“ Einteilungen nur 0,1 cm Unterschied in der Größensmessung oder eine gezählte Mitose mehr oder weniger über die Gruppenzugehörigkeit eines GIST entschied, entwickelten Joensuu et al. 2012 (b) aus einem Datensatz von über 2500 Patienten so genannte „heat maps“. Ausgehend von den Informationen Tumorlokalisation, Tumorgöße, Mitoseanzahl und Tumorruptur kann man also das Risiko eines Fortschreitens der Erkrankung nach einer Operation genauer abschätzen.

1.7 Klinischer Verlauf

50 % der GIST rezidivieren innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung. Am häufigsten sind Rezidive im Peritoneum oder Lebermetastasen (DeMatteo et al., 2000). Eine solche Metastasierung ist mit einer ungünstigen Prognose verbunden, im Zeitalter des Einsatzes von Tyrosinkinaseinhibitoren zunehmend häufiger mit einer Krankheitsstabilisierung über einen erstaunlich langen Zeitraum. Wegen der Möglichkeit einer späten Metastasierung ist ein langfristiges bzw. lebenslanges Follow-up erforderlich (Fletcher et al., 2002; Ginori et al., 2015; Miettinen und Lasota, 2013). Fernmetastasen außerhalb der Leber und des Peritoneums kommen seltener vor, werden aber in Einzelberichten geschildert (Akiyama et al., 2004; Anagnostoulis et al., 2007; Cil et al., 2011; Shabahang et al., 2002), so z. B. Metastasen im zentralen Nervensystem oder im Knochen (Naoe et al., 2011).

1.8 Therapie

1.8.1 Chirurgische Therapie

Da GIST nicht auf konventionelle Chemotherapien und Bestrahlung reagieren, war die komplette chirurgische Tumoresektion bis zur Entdeckung der Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren die einzige Therapiemöglichkeit. Das mediane Überleben lag bei

fortgeschrittenen GIST bei 10 – 17 Monaten (Nilsson et al., 2005). Nach wie vor ist die laparoskopische oder offene chirurgische Tumorentfernung die Therapie der Wahl bei Erstdiagnose eines lokalisierten GIST (Frankel et al., 2011; Liang et al., 2013; Pelletier et al., 2015).

1.8.2 Medikamentöse Therapie

2001 beschrieben Joensuu et al. im New England Journal of Medicine erstmals die Wirkung von Imatinib bei einer Patientin mit metastasiertem GIST mit herausragendem Erfolg. Imatinib (ursprünglich STI571, Glivec®, Novartis, Basel, Schweiz) ist ein synthetischer Tyrosinkinaseinhibitor, der an die inaktive Tyrosinkinasedomäne bindet, so die Bindung von ATP verhindert und dadurch die Phosphorylierung von KIT, PDGFR und BCR-ABL hemmt. Imatinib wird über das Cytochrom P450 System metabolisiert.

In einer Phase II Studie (B2222) profitierten Patienten mit einem Imatinib-Plasmaspiegel von über 1,100 ng/ml mit einem längeren progressfreien Überleben im Vergleich zu Patienten mit einem Plasmaspiegel von unter 1,100 ng/ml. Dies gilt insbesondere für GIST mit Primärmutation in *KIT* Exon 11 (Demetri et al., 2009). Diese Konzentration wird durch eine tägliche orale Einnahme von 300 – 400 mg (maximal bis 800 mg/ Tag) erreicht. Kommt es im Rahmen der Therapie mit der üblichen Dosierung (400 mg/ Tag) nicht zu einem Ansprechen, sollte die Dosierung auf maximal 800 mg/ Tag erhöht werden. Yoo et al. zeigten 2010, dass Patienten nach Resektion eines Großteils des Magens einen geringeren Imatinib-Plasmaspiegel aufweisen, hingegen scheinen Dünndarmresektionen keinen signifikanten Einfluss auf den Plasmaspiegel zu haben.

Als Nebenwirkungen sind Übelkeit, Durchfall, Wasserretention, Müdigkeit, Muskelkrämpfe, Bauchschmerzen und Exantheme beschrieben. Bei großen Tumoren ist eine gastrointestinale Blutung möglich, in der Regel wird Imatinib jedoch gut vertragen (Caram und Schuetze, 2011). Bei erhöhter Imatinibdosierung nimmt die Rate der Nebenwirkungen, insbesondere die gastrointestinalen Beschwerden, die Ödementwicklung und die kutanen Reaktionen zu, eine entsprechende symptomatische Therapie kann dann eine Dosisreduktion oder Therapieunterbrechung verhindern (Joensuu et al., 2011).

Insgesamt profitieren ca. 75 bis 90 % der Patienten von einer Therapie mit Imatinib, dieses Ansprechen ist abhängig von dem Primärmutationsstatus der Tumoren (Heinrich et al., 2006). Zusammenfassend liegt das Ansprechen auf Imatinib bei Primärmutationen

in *KIT* Exon 11 bei ca. 70 – 80 %, in *KIT* Exon 9 bei ca. 30 – 50 %. Wildtyp-GIST sprechen in bis zu 25 % auf Imatinib an (Demetri et al., 2002; Heinrich et al., 2003). Das mediane Überleben stieg durch die medikamentöse Therapie auf etwa 50 Monate an (Blanke et al., 2008).

Nach den beachtlichen Erfolgen mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib bei metastasiertem GIST war es naheliegend, auch den Einsatz als adjuvante Therapie nach kompletter Tumorentfernung bei „high risk“ Tumoren zu testen. Eine erste amerikanische Studie (Z9001) konnte bereits bei einjähriger Gabe die progressionsfreie Zeit signifikant verlängern (Dematteo et al., 2009). Eine Gabe über 3 Jahre verlängert das krankheitsfreie Intervall und auch das Gesamtüberleben (Joensuu et al, 2012 (a); Reichardt et al., 2012; Joensuu et al., 2015). Die aktuellen Richtlinien der European Society for Medical Oncology (ESMO) von 2014 empfehlen für Patienten mit „high risk“ GIST eine adjuvante Therapie mit 400 mg/ Tag Imatinib über 3 Jahre. Eine CT-Kontrolle sollte in den ersten zwei Jahren alle 3 – 4 Monate, im dritten bis fünften Jahr alle 6 Monate und im sechsten bis zehnten Jahr einmal jährlich erfolgen. Patienten mit „intermediate risk“ können ebenfalls eine adjuvante Therapie erhalten, diese Entscheidung sollte gemeinsam mit dem Patienten als Konsens getroffen werden (The ESMO/ European Sarcoma Network Group, 2014; Reichardt et al., 2012). Primär imatinibresistente GIST, z.B. GIST mit Primärmutation in *PDGFRA* Exon 18 (p.D842V) sowie Patienten mit einem Wildtyp-GIST, werden zumeist von einer adjuvanten Imatinibtherapie ausgeschlossen (Casali et al., 2012). Da die Prognose in der Mehrzahl dieser Fälle ohnehin besser ist als bei *KIT*-mutierten GIST, wird in der Regel auf eine adjuvante Therapie verzichtet.

Bei großen oder primär inoperablen Tumoren kann eine neoadjuvante präoperative Therapie mit einem Tyrosinkinaseinhibitor die Operation ermöglichen beziehungsweise deren Risiko minimieren. Ein allgemeingültiges Therapieschema existiert bislang nicht (Bednarski et al., 2014), die Mehrzahl der Patienten wird 6 bis 12 Monate vorbehandelt und auch nach erfolgter Operation mindestens bis zu einer Gesamtbehandlungsdauer von 3 Jahren weiterbehandelt.

1.9 Resistenzentwicklung unter Therapie mit Imatinib

1.9.1 Primäre Resistenz

Man unterscheidet zwischen primärer Resistenz, entsprechend einem Tumorprogress innerhalb der ersten 3 bis 6 Monate nach Therapiebeginn, und sekundärer Resistenz, entsprechend einem Tumorprogress nach den ersten 6 Monaten nach Therapiebeginn. Bis zu 14 % der GIST zeigen eine primäre Resistenz gegenüber Imatinib (Heinrich et al., 2008). Die wichtigste Ursache einer primären Resistenz ist die zugrunde liegende Mutation. So ist die *PDGFRA* Exon 18 Mutation p.D842V immer resistent, da durch den Austausch der Aminosäuren *PDGFRA* in der aktiven Form gehalten wird und somit eine Bindung von Imatinib nicht möglich ist. Dies konnte in vitro bestätigt werden, unterstützt wird diese Beobachtung auch durch den Nachweis einer p.D842V Sekundärmutation bei einem Patienten mit einem Primärtumor mit *KIT* Exon 11 Mutation und Sekundär-resistenz (Debiec-Rychter et al., 2005).

KIT Exon 9 Mutationen sind in der Gruppe der primär resistenten GIST in der Standard-dosierung von 400 mg Imatinib pro Tag häufiger resistent, da die durch die Mutation hervorgerufene Strukturveränderung der extrazellulären Domäne eine stabile Bindung von Imatinib verhindert (Heinrich et al., 2006).

Eine weitere Ursache der Primärresistenz kann in einem nicht ausreichenden Imatinib-spiegel liegen, in diesem Fall kann eine Erhöhung der Dosierung auf 800 mg/ Tag helfen. Die dann eventuell verstärkt auftretenden Nebenwirkungen sollten symptomorientiert behandelt werden (Gounder et al., 2011).

Lee et al. beschrieben in ihrer Metaanalyse Ende 2013 eine primäre Resistenz auf Imatinib in 50 % der *PDGFRA* mutierten GIST sowie in 33,4 % der Wildtyp-GIST. In der Gruppe der *KIT* mutierten GIST waren 8,9 % der Tumoren primär resistent, betroffen waren vor allem Mutationen in Exon 9.

1.9.2 Sekundäre Resistenz

Ca. 40 – 50 % der Patienten mit einem GIST entwickeln innerhalb der ersten 2 Jahre nach Therapiebeginn eine sekundäre Resistenz gegenüber Imatinib (Heinrich et al., 2008). Von der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML) mit Imatinib weiß man, dass mehr als 30 % der Patienten im Verlauf der Therapie eine Resistenz auf Imatinib entwickeln. Als Ursache konnten vor allem Sekundärmutationen in der BCR-ABL Kinase

Domäne nachgewiesen werden, seltener eine Amplifikation des BCR-ABL-Gens. Es ist mittlerweile gezeigt worden, dass diese Mechanismen auch in der Entwicklung einer Sekundärresistenz bei GIST eine Rolle spielen (Azam et al., 2003; Hochhaus et al., 2002; Reddy und Aggarwal, 2012).

1.10 Fragestellung

In Analogie hierzu war das vorrangige Ziel dieser Arbeit der Nachweis entsprechender Sekundärmutationen in *KIT* bei Patienten mit fortgeschrittenem GIST sowie die sich daraus ergebenden Fragen nach

- 1.) Frequenz und Lokalisation des Auftretens,
- 2.) der Assoziation zu bestimmten Primärmutationstypen,
- 3.) der Art der Sekundärmutationen und
- 4.) dem Einfluss der Sekundärmutationen auf den klinischen Verlauf.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Tumormanifestationen von Patienten mit fortgeschrittenem GIST vor und unter Therapie mit Imatinib in den Genabschnitten *KIT* Exon 14 und 15 auf mögliche Sequenzabweichungen untersucht. Diese Regionen wurden ausgewählt, da *KIT* Exon 14 die 1. Tyrosinkinase und *KIT* Exon 15 das Kinase-Insert zwischen beiden Tyrosinkinasen kodiert und hieraus Konformationsänderungen dieser Regionen anzunehmen sind, die sich auf die Bindung von Imatinib auswirken könnten. Zum Ausschluss der Möglichkeit, dass es sich bei gefundenen *KIT* Exon 14- oder 15-Mutationen um Primär- und nicht um Sekundärmutationen handelt, wurden außerdem 19 GIST (sog. Wildtyp-GIST) in diesen Genabschnitten untersucht.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der in vitro-Validierung des Effektes möglicher Sekundärmutationen. Durch eine In-vitro-Mutagenese sollten die gefundenen Mutationen in einen passenden Expressionsvektor kloniert werden, so dass das Konstrukt später in eine Zellreihe transferiert werden kann um die Auswirkungen der Sekundärmutation, insbesondere ihre Potenz im Sinne der Therapieresistenz in vitro, zu testen. Des Weiteren können mit Hilfe einer solchen Zellreihe mögliche neue Therapiesubstanzen im Rahmen von funktionellen Untersuchungen getestet werden.

2. Material und Methoden

Alle Untersuchungen sind auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt worden.

2.1 Patientenkollektive

Es wurden insgesamt 120 Tumorproben von 69 Patienten mit einem histologisch gesicherten GIST untersucht. Das Kollektiv unterteilte sich in 3 Gruppen:

28 Proben von 26 Patienten mit fortgeschrittenem GIST vor Therapie mit Imatinib (Gruppe A) sowie 68 Proben von 24 Patienten unter Therapie mit Imatinib (Gruppe B).

Zudem wurden 24 Proben von 19 Patienten mit einem Wildtyp-GIST (Gruppe WT) unabhängig von einer Therapie mit Imatinib auf eine Mutation in *KIT* Exon 14 und 15 untersucht, um festzustellen, ob derartige Mutationen auch als Primärmutationen auftreten könnten.

Die genauen klinischen Daten können Tabelle 3 – 7 im Anhang entnommen werden. Die Tumorproben wurden zumeist intraoperativ gewonnen, in einem Fall im Rahmen einer Autopsie (Fall B-12), in einem weiteren Fall im Rahmen einer Probeexzision (Fall WT-7). Die Gewebeproben wurden zunächst in 4%igem Formalin fixiert, anschließend automatisiert in Paraffin überführt, geschnitten und H & E gefärbt. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde die DNA extrahiert, so dass zu Beginn der hier vorlegten Arbeit die aus dem Tumormaterial nach Mikrodisektion extrahierte *KIT* DNA bereits vorlag.

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 Liste der Materialien

2.2.1.1 Lösungen, Puffer und Medien

Alle benötigten Lösungen und Puffer sind im Rahmen der entsprechenden Methode aufgeführt.

2.2.1.2 Kits

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Quick Change® Site Directed Mutagenese Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
DNA – Extraction Kit	Qiagen, Hilden
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

2.2.1.3 Primer

Sequenzierung Exon 14 und 15

14-F: 5`-TGG GAG GCA GAA TTA ATC-3`

14-R: 5`-CCC ATG AAC TGC CTG TC-3`

15-F: 5`-GAG TGC CCT TCT ACA TGT C-3`

15-R: 5`-CAT TGC TAC TGG GAA TGA TG-3`

In Vitro Mutagenese Exon 13, 14 und 17 (die veränderten Basen sind fettgedruckt dargestellt)

13-F: 5' GGT AAT CAC ATG AAT ATT **GCC** AAT CTA CTT GGA GCC TGC ACC 3'

13-R: 5' GGT GCA GGC TCC AAG TAG ATT **GGC** AAT ATT CAT GTG ATT ACC 3'

14-F: 5' GGC CCA CCC TGG TCA **TTG** **AAG** AAT ATT GTT GCT ATG G 3'

14-R: 5' CCA TAG CAA CAA TAT TCT **TCA** ATG ACC AGG GTG GG 3'

17-F: 5' ACC AGA GAC ATC AAG AAT GAT TCT AAT **GAT** GTG GTT AAA GGA 3'

17-R: 5' TCC TTT AAC CAC ATC **ATT** AGA ATC ATT CTT GAT GTC TCT GGC 3'

Sequenzierung der KIT-cDNA

KIT BamF 5' TAC GGA TCC ATC GCA GCT ACC GCG 3'

KIT F2 5' CTT CCC AAG GAC TTG AGG 3'

KIT F3 5' GCA TTC CCC AAA CCT GAA C 3'

KIT F4 5' CGT AGC TGG CAT GAT GTG C 3'

KIT F5 5' GCA CAT GAA ACC TGG AG 3'

KIT F6 5' CAG CTA ATT GAG AAG CAG 3'

KIT NotI R 5' CTA GCG GCC GCC AAA CAC TGA TTC TGC 3'

KIT R1 5' TAG AAG GCA CAG TCG AGG C 3'

KIT R2 5' GAT GTC TCT GGC TAG ACC 3'

KIT R3 5' TGA GTT CAG ACA TGA GG 3'

KIT R4 5' GAA CTC TGA ACC ACT AGC 3'

KIT R5 5' CAT AAC ACA TGA ACA CTC 3'

KIT R6 5' CAA GCA GCG GTC AAC AAG 3'

2.2.1.4 Restriktionsendonukleasen

DpnI	GmATC	Stratagene, La Jolla, USA
NotI	GC/GGCCGC	New England Biolabs, Frankfurt
Asp718	G/GTACC	Roche, Mannheim
PvuI	CGAT/CG	New England Biolabs, Frankfurt
PstI	CTGCA/G	New England Biolabs, Frankfurt
Apal	GGGCC/C	New England Biolabs, Frankfurt

2.2.1.5 Geräte

Cycler	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer für Agarose Gele	Fisherbrand, Schwerte
UV – Leuchttisch	INTAS, Göttingen
Sequenzierer	ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Weiterstadt
Schüttler	Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg
Vortex	Genie 2, Scientific Industries, NY, USA
Brutschrank	Memmert, Schwabach
Thermocycler	2720, Applied Biosystems, Weiterstadt
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

2.2.2 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR wurden die Exone 14 und 15 der *KIT*-DNA der zuvor genannten Tumormanifestationen vervielfältigt. Als Polymerase diente Platinum Taq 5 U/μl (Quiagen, Hilden). Die genannten Primer binden an Intronstrukturen nahe dem Exon, sodass das komplette Exon mit angrenzenden Intronbereichen amplifiziert wurde (Primer Exon 14-F, Exon 14-R, Exon 15-F und Exon 15-R wie in 2.2.1.3 angegeben).

Ansatz der PCR:		PCR-Bedingungen		
1 µl	DNA	Denaturierung	94 °C	3 Minuten
9,7 µl	Mix, bestehend aus	Annealing	94 °C	40 Sekunden
	50 µl Reaktionspuffer ohne MgCl2		57 °C	40 Sekunden
	15 µl MgCl2 (Quiagen, 25 mM)		72 °C	35 Sekunden
	10 µl dNTP (Fermantas, 10 mM)			
	10 µl Primer F (10 pmol/µl)	Elongation	72 °C	5 Minuten
	10 µl Primer R (10 pmol/µl)			
	2 µl Platinum Taq (Quiagen 5 U/µl)	Insgesamt	40 Zyklen	
ad 50 µl Aqua dest.		Programm CKIT 55 °C/57 °C		

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Ergebnisse der PCR wurden durch anschließendes Abschätzen der DNA-Konzentration durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft. Dafür wurden 10 µl der Probe mit 5 µl Ladepuffer versetzt und in die Kammern aufgetragen. Als Standard diente 1 µl PUC19 (Fermentas, Canada) versetzt mit 5 µl Ladepuffer und 5 µl Wasser. Die Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte bei 80 Volt über eine Stunde.

Pufferansatz:

10 x TBE-Puffer	900 mM	Tris
	900 mM	Borsäure
	10 mM	EDTA
Laufpuffer	1x TBE Puffer + 0,15 mg/ml Ethidiumbromid	
1 % (2 %) Agarosegel	5 g (10 g) Agarose in 500 ml 1 x TBE+75 µl EtBr	

Im Anschluss wurden die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.4 DNA – Extraktion aus dem Agarosegel

Nach Ausschneiden aus dem Gel wurde die DNA unter Verwendung von Microspin s-300 HR Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angabe des Herstellers aufgereinigt. Die so gewonnenen vervielfältigten *KIT* Exone 14 und 15 wurden im Folgenden als Templates für die Sequenzierreaktion verwendet. Die Menge der einzusetzenden DNA

wurde anhand der Bandenintensität in der Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt, sie betrug zwischen 2 – 8 µl pro Probe.

2.2.5 Bidirektionale Sequenzierung

Die anschließende bidirektionale Sequenzierung des gesamten Exons unter Einschluss der angrenzenden Intronbereiche erfolgte mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt). Hier sind die ddNTPs entsprechend ihrer vier verschiedenen Basen an vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gebunden.

Ansatz der Sequenzier-PCR		Sequenzier-PCR-Bedingungen (insgesamt 25 Zyklen)	
1 /	4 µl Terminator Ready Reaction Mix	96 °C	1 Minute
0 /	2 µl Puffer	96 °C	10 Sekunden
2 – 8 µl	Template	45 – 60 °C	5 Sekunden
1 µl	Primer F oder R (10 pmol/µl)	60 °C	4 Minuten
Ad 20 µl	Aqua dest.	4 °C bis zur Fällung	

Für die anschließende Analyse in der Kapillarelektrophorese wurden die Produkte der Sequenzierung mit Natriumacetat (3 mol/l) gefällt. Dafür wurde der Sequenzier-Reaktion 80 µl HPLC-H₂O, 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 250 µl 100 % EtOH zugegeben und die Probe 15 Minuten bei 15.000 Umdrehungen zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70 % EtOH gewaschen und getrocknet. Danach wurde es in 25 µl Template Suppressing Reagent (TSR) in ein Sequenzier-Eppendorfgefäß überführt, eine Minute bei 8000 Umdrehungen zentrifugiert und zuletzt über 5 Minuten bei 90 °C denaturiert. Die Denaturierung wird durch Lagerung auf Eis gestoppt. Die so in TSR aufgenommene DNA kann im ABI PRISM 310 Genetic Analyser Kapillarelektrophoresesystem analysiert werden. Die veränderten Sequenzen wurden über die Datenbank HUSAR identifiziert. (Zugangsnummer HSU638434, National Center for Biotechnology Information Database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Um PCR bedingte Artefakte auszuschließen, wurden alle Auffälligkeiten der 1. Sequenzierung durch eine 2. unabhängige PCR mit anschließender Sequenzierung kontrolliert und bestätigt.

2.3 In vitro Mutagenese der 3 neugefundenen Sekundärmutationen

2.3.1 Mutagenese – PCR

Die in-vitro-Mutagenese erfolgte mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA). Dieses Kit ermöglicht das Einbringen von Punktmutationen, Deletionen sowie Insertionen verschiedener Basenlängen in eine DNA-Sequenz. Als Ausgang dient die nicht mutierte cDNA in einem Plasmid, hier dem pBluescript-Vektor. Man benötigt zwei Primer, die die gewünschte Mutation möglichst in ihrer Mitte enthalten, als Enzym wird eine PfuTurbo DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) verwandt. Um die Fehlerrate möglichst gering zu halten, werden nur wenige PCR-Zyklen durchlaufen. Als Ausgangs-DNA diente die cDNA des *KIT*-Wildtyps (2,9 kb). Diese lag zu Beginn der Arbeit bereits in pBblueskriptSK-Vektor (3,0 kb) kloniert vor.

Ansatz der Mutagenese PCR		Mutagenese PCR-Bedingungen (insgesamt 15 Zyklen)	
5 µl	10 x Pfu Puffer	95 °C	30 Sekunden
1 µl	DNA (100 ng)	95 °C	30 Sekunden
1 µl	Primer F (Exon 13,14,17)	55 °C	1 Minute
1 µl	Primer R (Exon 13,14,17)	68 °C	11 Minuten 48 Sekunden *
1 µl	dNTP	4 °C	bis zur Weiterverarbeitung
1 µl	PfuTurbo DNA Polymerase		
ad 50 µl	HPLC-H ₂ O		* 2 Min/kb Plasmidlänge

Im PCR-Produkt finden sich parentale methylierte Wildtyp-DNA und nichtmethylierte Tochter-DNA.

2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Der Erfolg der Mutagenese-PCR wurde durch eine Gelelektrophorese bestätigt, indem das gesamte PCR Produkt (50 µl PCR-Produkt und 16,6 µl 6xLoading-Puffer) in ein 1 % Agarose-Gel gegeben wurde. Als Standard dienten 12 µg des 1kb-DNA Ladder (Firma Invitrogen, Karlsruhe). Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des DNA-Extraktions Kits der Firma Qiagen (Hilden) aus dem Gel extrahiert.

2.3.3 Aufreinigung der DNA mittels QIAquick spin column

Die ausgestochene Bande wurde zunächst gewogen, dann in 3 Volumen QG-Puffer 10 Minuten bei 50 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Zu der aufgelösten Agarose wurde anschließend 1 Volumen Isopropanol hinzugegeben, die Probe in eine QIAquick spin column (Quiagen, Hilden) gegeben und für 1 Minute bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, zur Probe 500 µl QG Puffer hinzugegeben und erneut 1 Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, die Probe mit 750 µl PE-Puffer versetzt und nach einer 2 – 5 minütigen Inkubationszeit 1 Minute bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Probe, um Alkoholreste zu entfernen, 2 Minuten bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches Gefäß überführt und mit 40 µl Wasser 1 Minute lang inkubiert. Durch erneute Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen wurde die DNA eluiert.

2.3.4 Verdau der Wildtyp – DNA mittels DpnI

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit DpnI verdaut. Dieses Enzym schneidet als Restriktionsendonuklease spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, nicht aber unmethylierte. So wird die parentale nichtmutierte DNA verdaut, und die in vitro entstandenen nichtmethylierten mutierten Tochterstränge bleiben intakt. Zur Probe wurde 1 µl DpnI (10 U/µl) gegeben, die Lösung durch auf- und abpipettieren vermischt, eine Minute zentrifugiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle des Verdaus erfolgte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese.

Ansatz: 10 µl Probe, 5 µl 6xPuffer, 5 µl 1kb – Standard

Das durch diese Schritte gewonnene neue Konstrukt konnte nun transformiert werden.

2.3.5 Transformation via Hitzeschock

Die bei -80 °C gelagerten kompetenten Bakterienzellen (E.coli Top10) wurden zunächst langsam auf Eis aufgetaut bevor 5 µl der DNA hinzugegeben wurden. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde die Probe 45 Sekunden lang auf 42 °C erhitzt, anschließend für 2 Minuten auf Eis gelagert, dann in 500 µl auf 42 °C aufgewärmtes LB-Medium (ohne Antibiotikum) aufgenommen und in einem Thermoschüttler bei 37 °C und 300 Umdrehungen für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden je 250 µl der Proben auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Durch die Ampicillinresistenz des pblueskriptSK-Vektors kann so eine erste Selektion positiver Klone erfolgen.

Ansatz:

LB – Medium ⁺ Ampicillin:	LB – Agar ⁺ Ampicillin:
1 % Trypton/ Pepton	LB – Medium ⁺ Ampicillin
0,5 % Hefeextrakt	2 % Agar
0,5 % NaCl	
100 µg/ml Ampicillin	

2.3.6 Minipräparation von Plasmid – DNA

Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA mittels einer Minipräparation analysiert. Je eine größere einzelne Kolonie wurde in 3 ml LB-Amp-Medium gegeben und über 12 – 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. 1,5 ml dieser Vorkultur wurden dann über 5 Minuten bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert, der Überstand anschließend abgegossen. Das Pellet wurde dann in 150 µl Puffer 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 150 µl Puffer 2 wurden die Bakterien lysiert und im 3. Schritt durch 150 µl Puffer 3 die Zelltrümmer präzipitiert. Nach Abzentrifugieren des Präzipitats (10 Minuten bei 13.000 Umdrehungen) wurde die Probe in den nächsten Schritten aufgereinigt.

Puffer 1: GTE-Mix (50 mM Glucose + 25 mM TRIS 8.0 + 10 mM EDTA)

Puffer 2: NaOH-SDS (Exp.: 0,2 M NaOH + 1 % SDS)

Puffer 3: 294g KOAc in 300 ml + 600 ml Eisessig pH 4,8 ad 1 Liter H₂O)

2.3.7 Phenol – Chloroform Extraktion

Je 150 µl Phenol und Chloroform wurden zu der Probe hinzugeben, anschließend wurde über 5 Minuten bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert. Der klare Überstand, in dem sich jetzt die Plasmid-DNA befindet, wurde in eine neues Gefäß überführt, mit 1 ml kaltem 100%igem Ethanol versetzt und 5 Minuten bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden 100 µl 80%iges Ethanol hinzugegeben und abschließend für 2 Minuten bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pipette entfernt und das Pellet ca. 15 Minuten bei 37 °C getrocknet, bevor es in 20 ml HPLC-Wasser gelöst wurde.

2.3.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNA-Lösung kann durch Extinktion der zu untersuchenden Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch abgeschätzt werden.

2.3.9 DNA – Restriktion mit NotI

Dafür erfolgte zunächst ein Restriktionsverdau mit NotI. Die Vektorkarte des pblueskriptSK (im Anhang dargestellt) zeigt nur eine Schnittstelle für NotI im Bereich der multiple Cloning Side Region und keine im Insert, so dass man das Plasmid mittels NotI linearisieren kann. Im Kontrollgel erwartete man also eine Bande von 5,9 kb, bestehend aus 2,9 kb cDNA und 3,0 kb Vektor.

Ansatz: 3 µl DNA + 2 µl Puffer + 1 µl NotI ad 20 µl H₂O, kurz vortexen, dann 1 Minute bei 8.000 Umdrehungen zentrifugieren und mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

2.3.10 Bidirektionale Sequenzierung

Die linearisierte DNA konnte im Anschluss durch eine Cycle-Sequenzierung (wie in 2.2.5 angegeben) analysiert werden.

Ansatz Exon 13:

8 µl	Terminator Ready Reaction Mix
1 µl	Template
1 µl	Primer F4 (10 µmol)
Ad 20 µl	Aqua dest.

Ansatz Exon 14:

8 µl	Terminator Ready Reaction Mix
5 µl	Template
1 µl	Primer F4 (10 µmol)
Ad 20 µl	Aqua dest.

Ansatz Exon 17:

8 µl	Terminator Ready Reaction Mix
3 µl	Template
1 µl	Primer F5
Ad 20 µl	Aqua dest.

Mit den entsprechenden Primern (Exon 13 und 14 Primer F4, Exon 17 Primer F5) wurde das jeweilige Exon sequenziert und das Vorhandensein der Mutation kontrolliert. Anschließend wurde das gesamte Gen sequenziert und auf unerwünschte Mutationen und deren Auswirkungen auf die Basenabfolge gescreent. Dies erfolgte mittels der in 2.2.1.3 angegebenen Primer *KIT* BamF, *KIT* F2-6, *KIT* R1-6 und *KIT* NotI R.

2.3.11 Retransformation in XL1 – Blue

Um das Material eines geeigneten Klons weiter zu vervielfältigen und gleichzeitig aufzureinigen, wurde die DNA zunächst in kompetente XL1-Blue Zellen nach der Methode des Hitzeschocks retransformiert (siehe 2.3.5).

5 µl der DNA wurden in 50 µl XL1-Blue Zellen gegeben, 30 Sekunden auf Eis gekühlt und anschließend 45 Sekunden bei 42 °C erhitzt. Die Reaktion wurde wie oben angeführt über 2 Minuten auf Eis gestoppt, dann in vorgewärmtem LB-Medium über 1 Stunde bei 37 °C in einem Thermoschüttler bei 300 Umdrehungen inkubiert und im Anschluss in 200 ml 1xLB+Ampicillin gegeben.

2.3.12 Maxipräparation von Plasmid – DNA

Die neu transformierte Plasmid-DNA konnte unter Zuhilfenahme des Hi Speed Maxi Kits der Firma Qiagen in größeren Mengen isoliert werden. Die Methode entspricht weitestgehend der Methode der Minipräparation, bei beiden wird die DNA durch alkalische Lyse isoliert und anschließend durch eine Anionenaustauscher-chromatographie mittels DNA-bindender Säule gereinigt. Die verwendeten Puffer 1, 2 und 3 sind in 2.3.6 beschrieben.

Im ersten Schritt wurden die Bakterien 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer 1 resuspendiert, die Zellen durch Zugabe von 10 ml Puffer 2 und 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden 10 ml kalter Puffer 3 hinzugegeben und die Probe 10 Minuten bei Raumtemperatur gevortext und inkubiert. Nachdem die High Speed Midi TIP mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert wurde, wurde das Lysat zugegeben und ausgepresst, mit 60 ml QC-Puffer gewaschen und mit 15 ml QF-Puffer gelöst, anschließend mit 10,5 ml Isopropanol vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde in die zugehörige Spritze gegeben und durch den entsprechenden Filter gepresst. Die DNA befand sich nun im Filter, aus dem sie mit 600 µl

sterilem Wasser in ein neues Gefäß gewaschen wurde. Die DNA-Konzentration konnte nun photometrisch bestimmt werden. Die so gewonnene DNA wurde wie in 2.3.9 mit NotI linearisiert, das Ergebnis in einer Gel-Elektrophorese (siehe 2.3.2) kontrolliert.

2.3.13 Klonierung in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1

Die Klonierung des Konstruktes aus dem pBlueskript-Vektor in den pcDNA3.1-Vektor erfolgt mittels Restriktion des Inserts durch die Restriktionsendonukleasen NotI und Asp718. Die Vektorkarten und jeweiligen Multiple Cloning Sites sind im Anhang dargestellt.

2.3.14 Ethanolfällung

Zur Aufreinigung der DNA wurde eine Ethanolfällung durchgeführt, dazu wurden zu 500 µl der Probe 1000 µl 100%iges Ethanol und 150 µl 3 M Natriumacetat hinzugegeben, die Probe 2 mal invertiert, für 25 Minuten bei -25 °C inkubiert und anschließend 20 Minuten bei 4 °C und 13000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, dem Pellet 100 µl 70%iges Ethanol hinzugegeben und die Probe erneut 20 Minuten bei 4 °C und 13000 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl sterilem Wasser gelöst.

Erneut erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung und ein anschließender Verdau mit NotI sowie eine erneute Aufreinigung mittels Ethanolfällung.

Ansatz Verdau mit NotI:

10 µl Konstrukt; 7 µl Puffer 3; 3 µl RNase; 6 µl NotI; 0,7 µl BSA; mit sterilem Wasser ad 70 µl; Inkubation 6 Stunden bei 37 °C

Ansatz Ethanolfällung:

70 µl Konstrukt; 140 µl 100%iges Ethanol; 3 µl 3 M Natriumacetat.

Nach zweimaligem Invertieren wurde die Probe 25 Minuten bei -20 °C inkubiert, 20 Minuten bei 4 °C und 13.000 Umdrehungen zentrifugiert, der Überstand verworfen, 100 µl 70%iges Ethanol zum Pellet gegeben und 20 Minuten bei 4 °C und 13.000 Umdrehungen zentrifugiert, im Anschluss der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.15 Verdau mit Asp718 und PvuI

Die Reaktion wurde nun mit Asp718 geschnitten. Da die zu erwartenden Banden der mutierten cDNA und des Rest-Vektors gleichgroß wären, wurde pBlueskript noch mit PvuI geschnitten. So konnte die eingefügte c-DNA in der folgenden Gelelektrophorese sicher identifiziert werden.

Ansatz:

Pellet; 7 µl Puffer B; 3,5 µl Asp718; 3,5 µl PvuI; 57 µl H₂O; Inkubation über Nacht bei 37 °C

Am Folgetag wurde der Verdau auf ein Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese trennt die Fragmente auf, so dass, insbesondere durch das zusätzliche Schneiden des Rest-vektors, die mutierte cDNA sicher identifiziert werden kann. Man erwartet die mutierte cDNA als größte Bande mit 2,9 kb, zusätzlich 2 kleinere Banden, den durch PvuI zusätzlich geschnittenen Vektor.

Die Bande der cDNA wurde ausgeschnitten und (wie oben angeführt) aus dem Gel extrahiert, anschließend erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung.

2.3.16 Vorbereitung von pcDNA3.1 mittels Verdau mit NotI und Asp718

Der eukaryonte Expressionsvektor pcDNA3.1 wurde durch Verdau mit NotI im ersten und Asp718 im zweiten Schritt für die Einklonierung vorbereitet.

Ansatz Verdau mit NotI:

10 µl pcDNA3.1; 7 µl Puffer 2; 3 µl RNase; 6 µl NotI; 0,7 µl BSA (BSA: Bovines Serumalbumin) ad 70 µl H₂O.

Der Ansatz wurde über 6 Stunden bei 37 °C inkubiert, im Anschluss mit Ethanol wie in Punkt 2.3.14 gefällt. In einem 2. Schritt wurde der Vektor nach der Fällung mit Asp718 verdaut.

Ansatz: Lösung des Pellets in 7 µl Puffer B; 6 µl Asp 718; ad 60 µl H₂O und Inkubation bei 37 °C über Nacht.

Am Folgetag wurde der Erfolg der Restriktion durch eine Gelelektrophorese kontrolliert, die gewünschte Bande (5,4 kb) ausgeschnitten und die Konzentration photometrisch bestimmt. Zur Weiterverarbeitung musste der Vektor nun dephosphoryliert werden.

2.3.17 Dephosphorylierung von DNA – Fragmenten

Um eine Religierung der entstandenen Fragmente des Vektors zu erschweren, wurden die am 5' Ende verbleibenden Phosphatreste mittels SAP (shrimp alkaline phosphatase) entfernt.

Ansatz: 4 µl pcDNA3.1; 1 µl SAP; 1 µl 10xPuffer; 4 µl HPLC-H₂O

Die Reaktion wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, die SAP dann durch 15 minütiges Erhitzen auf 65 °C irreversibel inhibiert.

2.3.18 Ligation

Für die Ligation wurde ein Verhältnis 3:1 gewählt, d.h. es wurde dreimal mehr cDNA verwendet als pcDNA3.1.

Ansatz:

10 µl dephosphorylierter pcDNA3.1; 3 µl Konstrukt; 2 µl T4 Ligase; 2 µl 10xPuffer; 3 µl steriles H₂O. Der Ansatz wurde kurz gevortext und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Das Ergebnis wurde durch eine Transformation in E.coli XL1-Blue, sich anschließender Minipräparation (je 10 Kulturen) und einem folgenden analytischen Verdau mit PstI und Apal kontrolliert. Die Transformation in E.coli Zellen erfolgte mittels Hitzeschock, die Kultivierung und Minipräparation wie oben angeführt.

2.3.19 Analytischer Verdau mit PstI und Apal

PstI hat 4 Schnittstellen: Zwei davon befinden sich an Position 2164 bp und 2848 bp im Insert, zwei an Position 962 bp und 2318 bp im Vektor. Man erwartete also nach erfolgreicher Ligation in korrekter Orientierung 4 Fragmente in den Größenordnungen 100 bp, 680 bp, 1360 bp und 6100 bp.

Apal hat 2 Schnittstellen: Eine an Position 2016 bp im Insert, eine an Position 1002 bp im Vektor, demzufolge erwartete man 2 Fragmente in den Größenordnungen 1 bzw. 7 kb.

Ansatz Verdau mit PstI: 3 µl DNA; 2 µl Puffer 3; 1 µl PstI ad 20 µl H₂O

Der Ansatz wurde über eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Gelelektrophorese kontrolliert.

Ansatz Verdau mit Apal: 3 µl DNA; 2 µl Puffer 4; 1 µl Apal ad 20 µl H₂O

Der Ansatz wurde über eine Stunde bei 25 °C inkubiert und anschließend ebenfalls mittels

Gelelektrophorese durchgeführt.

Durch eine Maxipräparation (siehe 2.3.12) wurde das Material vervielfältigt. Nach einer Säulenaufreinigung konnte es nun sequenziert werden. Aufgrund der häufigen unerwünschten Begleitmutationen wurde das gesamte Exon sequenziert.

3. Ergebnisse

Es wurden insgesamt 120 Proben von 69 Patienten mit einem histologisch gesicherten fortgeschrittenen GIST auf eine Mutation in *KIT* Exon 14 und Exon 15 untersucht. 28 Proben stammten von 26 Patienten vor Beginn der Therapie mit Imatinib, 68 Proben von 24 Patienten unter Therapie mit Imatinib, bei 12 dieser 24 Patienten lag zudem Material des Primärtumors aus der Zeit vor Beginn der Therapie zum Vergleich vor. Außerdem wurden 24 Proben von 19 Patienten mit einem Wildtyp-GIST auf Mutationen in *KIT* Exon 14 und 15 gescreent.

3.1 Klinisch – pathologische Parameter

Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

Es wurden 28 Tumorproben von 26 Patienten mit einem histologisch bestätigtem metastasierten beziehungsweise inoperablen GIST vor Beginn der Therapie mit Imatinib untersucht. In 92 % wurde der Primarius untersucht, in jeweils einem Fall (4 %) ein Rezidiv beziehungsweise eine Peritonealmetastase. Das Material wurde in allen Fällen intraoperativ gewonnen.

Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

In dieser Gruppe wurden 68 Tumorproben von 24 Patienten mit histologisch bestätigtem primär inoperablen oder metastasierten GIST unter Therapie mit Imatinib untersucht. In 12 der 24 Fälle (50 %) wurde Material aus mehreren Tumormanifestationen unter Therapie mit Imatinib untersucht, bei ebenfalls 12 der 24 Patienten (50 %) konnte diese Probe mit Material des Primärtumors vor Beginn der Therapie mit Imatinib verglichen werden.

Gruppe WT – Patienten mit einem Wildtyp-GIST

Es wurden 24 Proben von 19 Patienten mit einem histologisch bestätigten GIST ohne Nachweis einer Primärmutation in den bekannten Hot-Spot-Regionen auf eine Mutation in *KIT* Exon 14 und 15 untersucht. In allen Fällen lagen ausschließlich Proben des Primärtumors vor, in 10 Fällen wurden die Proben intraoperativ gewonnen, in einem Fall via Probeexzision, in den restlichen Fällen lagen keine Angaben zur Probengewinnung vor.

3.1.1 Alter und Geschlecht

Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

Das Geschlechterverhältnis war mit 13 Männern und 13 Frauen ausgeglichen, das Alter lag im Mittel und Median bei 59 Jahren mit einer Spannbreite von 26 bis 79 Jahren, 81 % der Patienten waren über 50 Jahre alt.

Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

Es wurden Proben von 17 Männern und 7 Frauen (Verhältnis 2,4:1) untersucht, das Alter lag im Median bei 56 Jahren (Mittelwert 63 Jahre, Spannbreite 38 bis 72 Jahre); 79 % der Patienten waren über 50 Jahre alt.

Gruppe WT – Patienten mit einem Wildtyp-GIST

Das Geschlechterverhältnis war mit 10 Frauen und 9 Männern annähernd ausgeglichen, das Alter lag im Median bei 62 Jahren (Mittelwert 61 Jahre, Spannbreite 14 bis 83 Jahre), 79 % der Patienten waren über 50 Jahre alt.

3.1.2 Lokalisation des Primärtumors

Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

Bei 25 der 26 Patienten lagen Daten zur Primärlokalisierung vor. Der Primärtumor fand sich in 50 % der Fälle im Dünndarm, in 35 % im Magen, je 4 % wurden im Ösophagus, im Bereich der linken Flexur und extraintestinal gefunden.

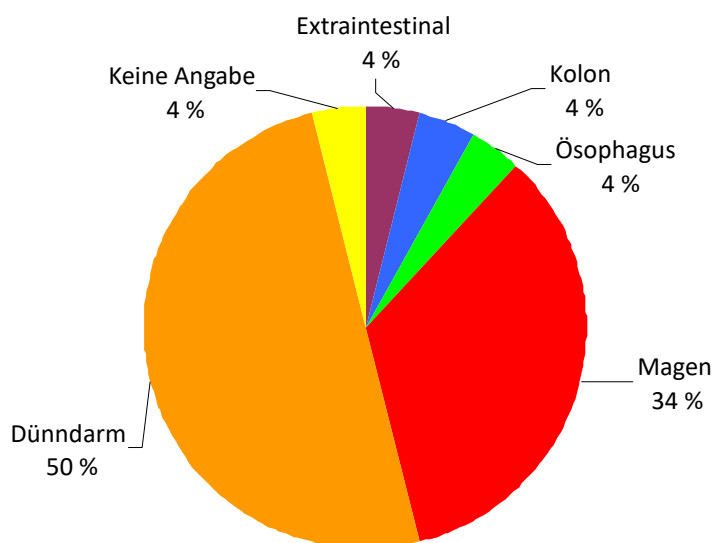


Abb. 4: Lokalisation des Primärtumors in der Gruppe A

Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

Bei 23 der 24 Patienten lagen Daten zur Primärlokalisation vor. 54 % der Primärtumoren fanden sich im Bereich des Dünndarms, 13 % gingen vom Magen, 8 % vom Rektum aus. 21 % wurden extraintestinal im Peritoneum gefunden.

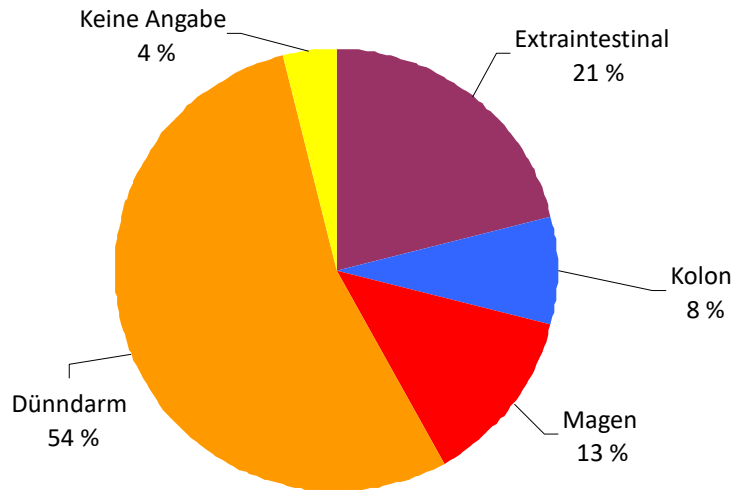


Abb. 5: Lokalisation des Primärtumors in der Gruppe B

Gruppe WT – Patienten mit einem Wildtyp-GIST

In allen Fällen lagen Daten zur Lokalisation des Primärtumors vor, 69 % gingen vom Magen aus, 26 % vom Dünndarm und 5 % vom Ösophagus.

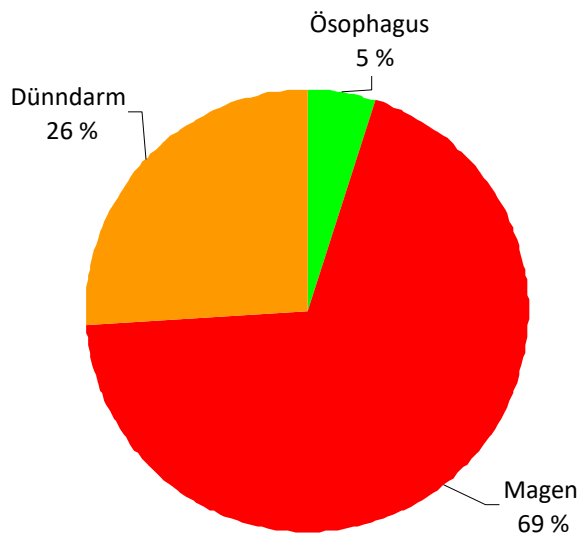


Abb. 6: Lokalisation des Primärtumors in der Gruppe WT

3.1.3 Histologische Charakteristika der Primärtumoren

Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

Es lagen für alle 26 Primärtumoren Daten zur histologischen Einteilung vor, demnach waren 17 als spindelzellig klassifiziert (65 %), 2 als epitheloidzellig (8 %), 7 Proben konnten dem gemischten Subtyp zugeordnet werden (27 %).

Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

Daten zur histologischen Einteilung lagen für 12 Primärtumoren vor. Hiervon waren 11 Proben als spindelzellig klassifiziert (92 %), eine konnte dem gemischten Subtyp zugeordnet werden (8 %).

Gruppe WT – Patienten mit Wildtyp-GIST

Es lagen für 15 der 19 Primärtumoren Daten zur histologischen Einteilung vor, demnach waren 10 als spindelzellig klassifiziert (67 %), 2 als epitheloidzellig (13 %), 3 Tumoren konnten dem gemischten Subtyp zugeordnet werden (20 %).

3.1.4 Größe des Primärtumors

Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

In 85 % der Fälle lagen Daten zur Größe des Primärtumors vor. 14 % waren kleiner/ gleich 5 cm, 36 % zwischen 5,1 und 10 cm, 50 % größer als 10 cm groß. Im Mittel und Median waren diese Tumoren 10 cm groß mit einer Schwankungsbreite von 2 bis 25 cm.

Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

Bei 67 % der Fälle lagen Daten zur Größe des Primärtumors vor, kein Primärtumor war kleiner/gleich 5 cm, 37,5 % zwischen 5,1 und 10 cm und 62,5 % größer als 10 cm groß. Im Mittel waren diese Tumoren 12 cm groß, im Median 12,5 cm mit einer Schwankungsbreite von 5,5 bis 20 cm.

Gruppe WT – Patienten mit einem Wildtyp-GIST

In dieser Gruppe lagen bei 95 % der Fälle Daten zur Größe des Primärtumors vor, 61 % waren kleiner/gleich 5 cm, 22 % zwischen 5,1 und 10 cm und 17 % größer als 10 cm groß.

Im Mittel waren diese Tumoren 5,5 cm groß, im Median 3,6 cm mit einer Schwankungsbreite von 0,1 bis 22 cm.

3.1.5 Dignität

Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

Es lagen zu allen Fällen Angaben über die Anzahl der Mitosen der Primärtumoren pro 50 HPF (HPF = high power field) vor. Im Mittel konnten 12,6, im Median 9 Mitosen pro 50 HPF gesehen werden, die Schwankungsbreite lag bei 0 bis 60 Mitosen pro 50 HPF.

In 81 % der Fälle lagen Daten zur Dignitätseinstufung nach Miettinen et al., 2006 vor. 84 % wurden als Tumoren mit hohem Risiko, 10 % mit intermediärem und 16 % mit geringem Risiko eingestuft.

Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

In 12 der 24 Fälle (50 %) lagen Angaben über die Anzahl der Mitosen pro 50 HPF der Primärtumoren vor. Im Mittel konnten 40, im Median 13 Mitosen pro 50 HPF gesehen werden, die Schwankungsbreite lag bei 1 bis 135 Mitosen pro 50 HPF.

In 46 % der Fälle lagen Angaben zur Dignitätseinstufung des Primärtumors nach Miettinen et al., 2006 vor. 91 % wurden als Tumoren mit hohem Risiko, 9 % als Tumoren mit intermediärem Risiko und kein GIST wurde als Tumor mit geringem Risiko eingestuft.

Gruppe WT – Patienten mit einem Wildtyp-GIST

In allen Fällen lagen Daten zur Anzahl der Mitosen vor, in 18 von 19 Fällen pro 50 HPF (high power field), in einem der 19 Fälle pro 25 HPF. Im Mittel konnten 7,5, im Median 0 Mitosen pro 50 HPF gesehen werden, die Schwankungsbreite lag bei 0 bis 50 Mitosen pro 50 HPF. Im Fall WT-19 konnte keine Mitose pro 25 HPF gesehen werden.

In 89 % der Fälle lagen Daten zur Dignitätseinstufung der Primärtumoren nach Miettinen et al., 2006 vor. 18 % wurden als Tumoren mit hohem, weitere 18 % mit intermediärem Risiko eingestuft, ein Fall (6 %) zeigte ein geringes Rückfallrisiko, 18 % ein sehr geringes und 41 % wurden ohne Rückfallrisiko eingestuft.

3.1.6 Molekulare Diagnostik bezüglich der Primärmutation

Bei allen Proben lagen Mutationsergebnisse in *KIT* Exon 9, 11, 13 und 17 sowie in *PDGFRA* Exon 12 und 18 vor.

Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

In 73 % (19/26) der Fälle konnte eine Primärmutation nachgewiesen werden, diese betraf in allen Fällen *KIT*. Von diesen war in 73 % der Fälle (14/19) Exon 11 betroffen, in 16 % (3/19) Exon 9 und in 11 % (2/19) Exon 13. 27 % (7/26) des Gesamtkollektivs wiesen einen Wildtyp für *KIT* und *PDGFRA* auf. Primärmutationen in *KIT* Exon 17 oder *PDGFRA* lagen nicht vor.

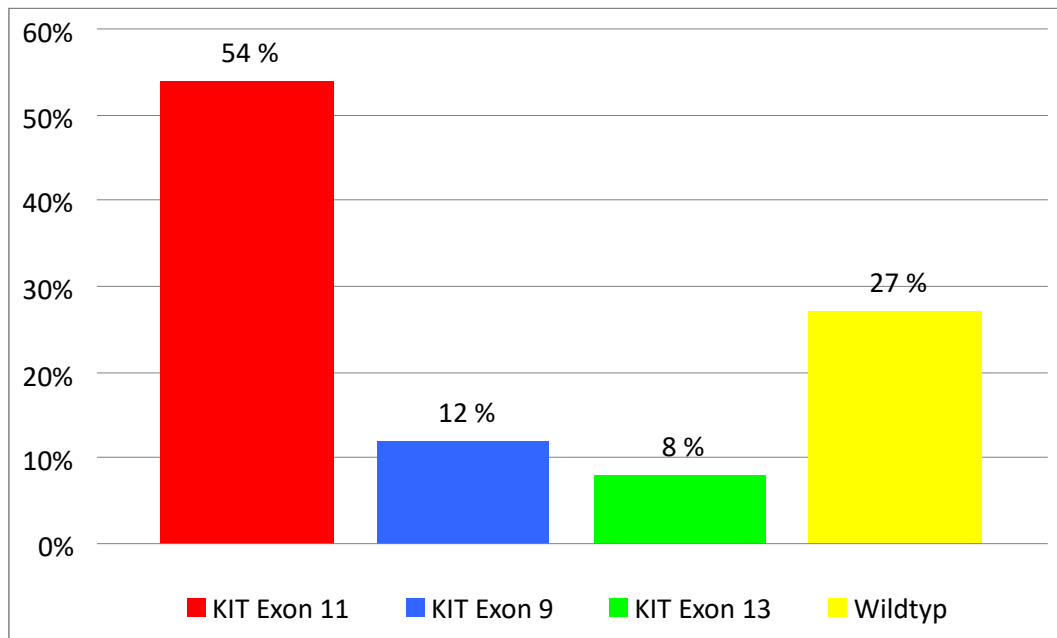


Abb. 7: Verteilung der Primärlokalisierung in der Gruppe A

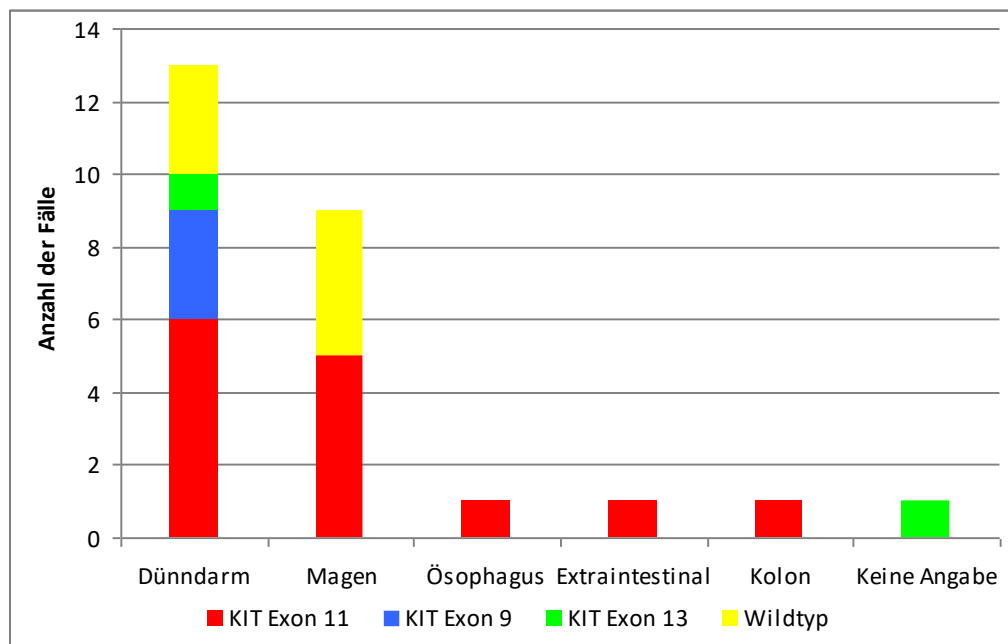


Abb. 8: Verhältnis Primärlokalisierung und Primärmutation in der Gruppe A

Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

Als Primärmutation konnte in 20 von 24 Fällen (83 %) eine Mutation in *KIT* festgestellt werden, davon war in 14 Fällen Exon 11 betroffen, in 6 Fällen Exon 9. Bei 3 Patienten (13 %) lag ein Wildtyp-GIST vor, in einem Fall lagen keine Angaben zum Mutationsstatus vor (4 %). Mutationen in *KIT* Exon 13, 17 oder *PDGFRA* kamen nicht vor.

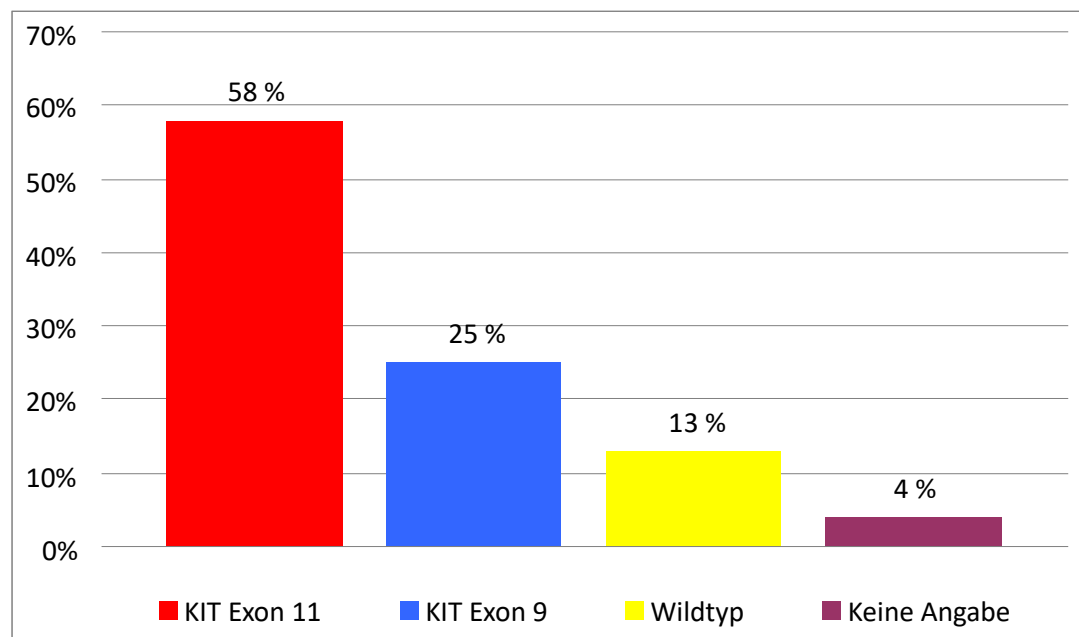


Abb. 9: Verteilung der Primärmutation in der Gruppe B

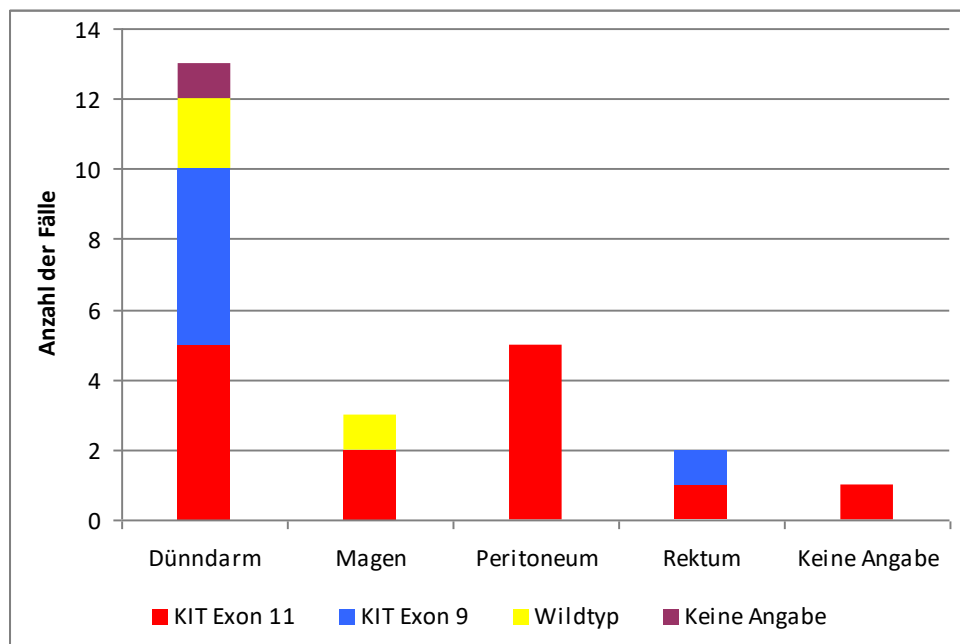


Abb. 10: Verhältnis Primärlokalisierung und Primärmutation in der Gruppe B

Gruppe WT – Patienten mit Wildtyp-GIST

Definitionsgemäß wurden in diesen Proben keine Mutationen in den oben angeführten Exonen gefunden.

3.1.7 Klinischer Verlauf

Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

Bei 19 % der Patienten konnte bereits bei Erstdiagnose eine Metastasierung nachgewiesen werden. Im Verlauf entwickelten dann weitere 73 % der Patienten einen Tumorprogress (insgesamt 92 %). Bis zum Nachweis des Progresses der Erkrankung vergingen im Median 11 Monate (Mittelwert 16 Monate, Range 0 – 48 Monate). In einem Fall ist der Zeitraum bis zur Diagnose eines Rezidivs nicht bekannt. In einem Fall gibt es keine Angaben über den klinischen Verlauf, in einem Fall konnte bis zum Ende des Follow-up kein Progress nachgewiesen werden.

Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

Bei Erstdiagnose waren bei 25 % der Patienten Metastasen nachweisbar, im Verlauf entwickelten weitere 71 % einen Tumorprogress (insgesamt 96 %). Bis zum Auftreten des Progresses vergingen im Median 6 Monate, im Mittel 19,5 Monate mit einer Schwankung von 0 – 108 Monaten. Bei einem Patienten mit primär inoperablem Tumor konnten auch im Verlauf keine Metastasen nachgewiesen werden (Fall B-17).

Gruppe WT – Patienten mit einem Wildtyp-GIST

Es lagen keine Daten zum klinischen Verlauf vor. ‘

3.1.8 Ansprechen auf Imatinib, Follow – up und Outcome

Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

3 der 26 GIST (12 %) waren primär resistent und sprachen nicht auf die Therapie mit Imatinib an. Alle 3 primär resistenten GIST waren Wildtyp-GIST. Unter Therapie erreichte ein Patient (4 %) eine komplette Remission, 54 % (14/26) eine partielle Remission, 15 % (4/26) eine Stabilisierung der Erkrankung, 19 % (5/26) einen sekundären Progress. Das mediane Ansprechen dieser 23 Patienten lag bei 23 Monaten (Range 14 bis 48 Monate). Bei dem Patienten mit kompletter Remission lag als Primärmutation eine *KIT* Exon 9 Mutation vor. Eine partielle Remission und eine Stabilisierung der Erkrankung erreichten 12 Patienten mit einer Primärmutation in Exon 11, je ein Patient mit Primärmutation in Exon 9 und 13 sowie 3 mit einem Wildtyp-GIST. 2 Patienten mit Primärmutation in Exon 11 sowie jeweils ein Patient mit einer Primärmutation in Exon 9 und 13 sowie ein Patient mit einem Wildtyp-GIST entwickelten einen sekundären Progress. Daten zum klinischen Outcome lagen nur in 3 der 26 Fälle vor, diese 3 Patienten verstarben 22, 23 beziehungsweise 60 Monate nach Diagnosestellung (Fall A-1, A-8 und A-22).

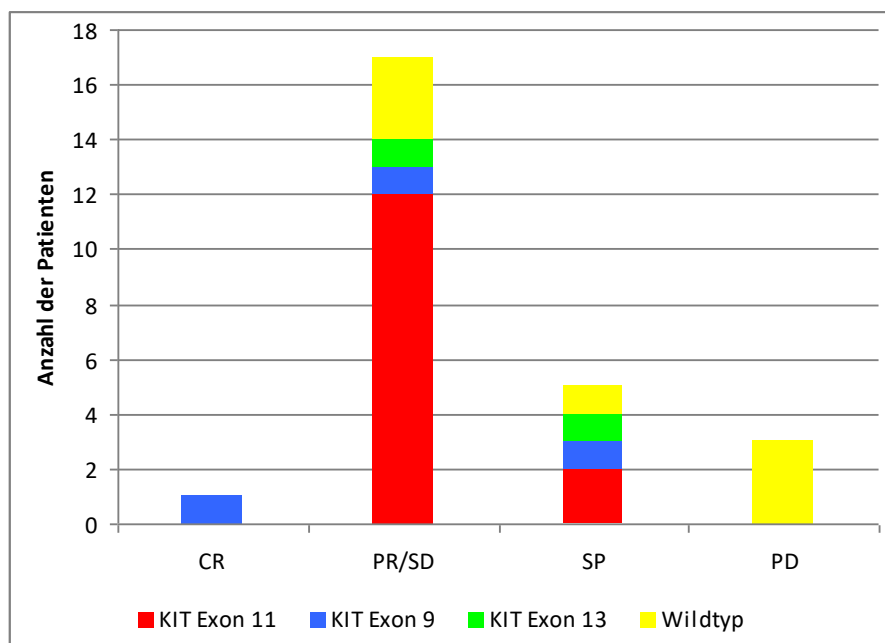


Abb. 11: Ansprechen auf die Therapie mit Imatinib in Abhängigkeit zur Primärmutation Gruppe A; CR-complete response, PR-partial response, SD-stable disease, SP-secondary progress, PD-progressive disease

Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

2 der 24 (8 %) GIST waren primär resistent und sprachen nicht auf die Therapie an, in einem Fall lag als Primärmutation eine Exon 9 Mutation vor, im anderen Fall lag ein Wildtyp-GIST vor.

Unter Therapie zeigten 5 Patienten (21 %) eine partielle Remission beziehungsweise eine Stabilisierung der Erkrankung, in 3 dieser Fällen lag eine Exon 11, in einem Fall eine Exon 9 Primärmutation vor, ein GIST entsprach einem Wildtyp-GIST. 17 Patienten (71 %) zeigten im Verlauf ein Fortschreiten der Erkrankung, im Median nach 6 Monaten (0 bis 108 Monate). 11 dieser Fälle trugen eine Exon 11 Primärmutation, 4 eine Exon 9 Primärmutation, ein GIST entsprach einem Wildtyp-GIST, in einem Fall lagen keine Daten zur Primärmutation vor. Das mediane Überleben bei sekundärem Progress lag bei 56 Monaten. Das mediane Follow-up vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur letzten Evaluation betrug 49,5 Monate (4 bis 144), in dieser Zeit verstarben 16 der 24 Patienten (67 %) an ihrer Erkrankung im Median 48 Monate nach der Erstdiagnose (Schwankungsbreite 5 bis 132 Monate).

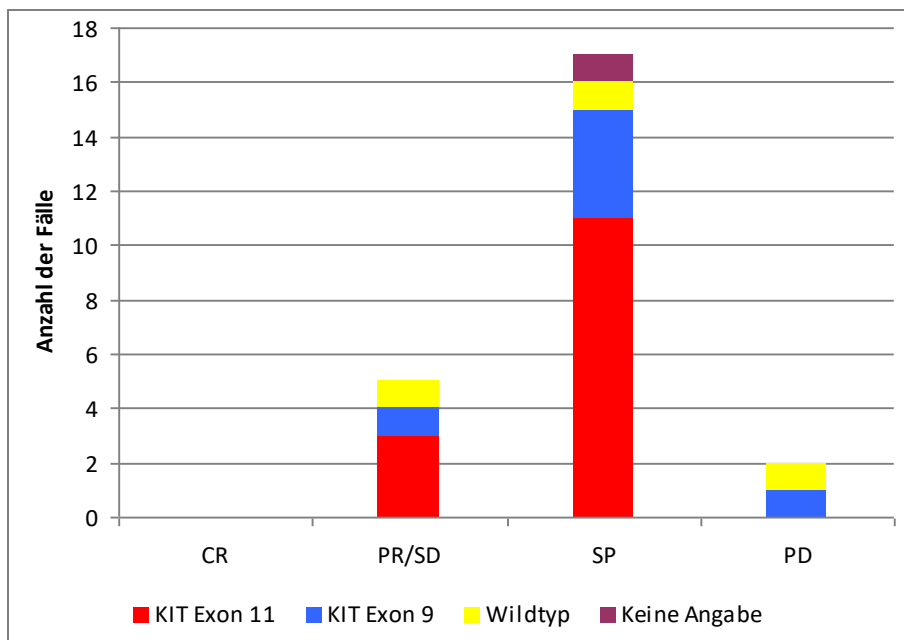


Abb. 12: Ansprechen auf Imatinib in Bezug zur Primärmutation Gruppe B; CR-complete response, PR-partial response, SD-stable disease, SP-secondary progress, PD-progressive disease

Gruppe WT – Patienten mit einem Wildtyp-GIST

Daten über eine Therapie mit Imatinib liegen nicht vor.

3.2 Nachweis von Mutationen in *KIT* Exon 14 und 15

3.3 Nachweis einer Sekundärmutation in *KIT* Exon 14 bei 2 Patienten unter Therapie mit Imatinib

Bei 2 der 24 Patienten, deren Tumormanifestationen unter Therapie mit Imatinib untersucht wurden, konnte in jeweils einer Manifestation eine neu aufgetretene Mutation in *KIT* Exon 14 nachgewiesen werden. Diese Mutation betrifft in beiden Fällen Codon 670, es kommt durch einen Austausch zweier Basen (ACA zu GAA) zum Austausch von Threonin zu Glutaminsäure (p.T670E).

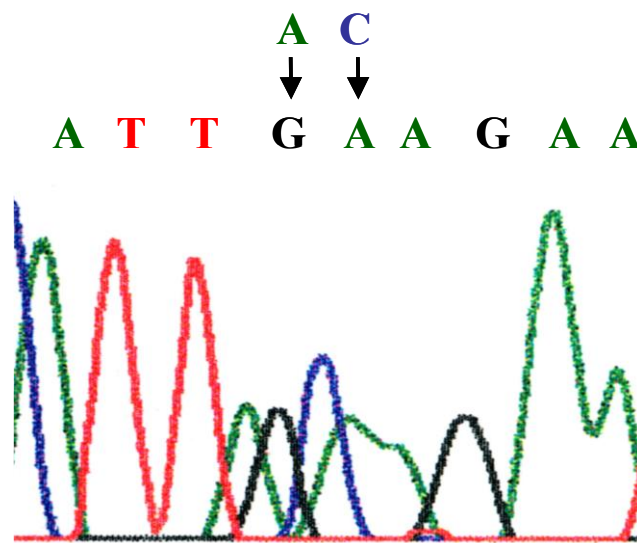


Abb. 13: Sequenzierungsausschnitt der gefundenen Sekundärmutation p.T670E

Der erste Patient war ein 56 Jahre alter Mann. 10 Monate nach Erstdiagnose eines 15 cm großen GIST im Ileum (12/98) entwickelten sich peritoneale Metastasen (10/99). Trotz Therapie mit Imatinib (Start 4/01) war die Erkrankung weiter progredient, und der Patient verstarb im Rahmen eines Tumordebulking 06/02 14 Monate nach Beginn der Therapie mit Imatinib und 42 Monate nach Erstdiagnose. In allen Proben (5 Peritonealmetastasen) wurde als Primärmutation eine *KIT* Exon 9 Mutation (6 Basenpaar Insertion p.A504_Y505ins) nachgewiesen. Die Neumutation p.T670E konnte nur in einer Peritonealmetastase nachgewiesen werden, die anderen Metastasen wiesen einen Wildtyp in *KIT* Exon 14 auf.

Beim zweiten Patienten handelte es sich um eine 56 jährige Frau, bei der 1995 ein Leiomyom des Dünndarms diagnostiziert wurde. Nach Entwicklung von Peritonealmetastasen im Jahr 2000 wurde die Diagnose geändert und unter dem Eindruck eines Leiomyosarkoms eine Chemotherapie begonnen. Eine erneute Überprüfung der

Diagnose erbrachte die Diagnose eines GIST, und im Oktober 2001 wurde eine Therapie mit Imatinib begonnen. Nach 24 Monaten Therapie war der GIST sekundär progredient. Bis zum Ende des Follow-up 8 Jahre nach Stellung der Erstdiagnose lebte die Patientin mit der Erkrankung. In allen Proben (Metastasen aus Omentum, Mesenterium, Dünndarm und Peritoneum) konnte als Primärmutation eine Punktmutation in *KIT* Exon 11 (p.V560D) nachgewiesen werden. In einer Probe aus einer Peritonealmetastase konnte zudem die *KIT* Exon 14 Sekundärmutation (p.T670E) nachgewiesen werden. Zum Vergleich lag bei dieser Patientin Material aus dem ersten Lokalrezidiv vor Therapiebeginn vor, in dieser Probe, wie auch in den anderen Metastasen, lag ein Wildtyp in *KIT* Exon 14 vor.

Beim ersten Patienten war der Tumor unter Therapie primär progredient, der GIST der zweiten Patientin sprach zunächst auf die Therapie mit Imatinib an und war 2 Jahre nach Therapiebeginn sekundär progredient.

Bei 12 Patienten (Fälle B-12, B-13, B-14, B-15, B-16, B-17, B-18, B-19, B-20, B-21, B-22, B-24) lag zusätzlich zur Probe der Tumormanifestation, die unter Therapie mit Imatinib gewonnen wurde, eine Probe des Primärtumors vor Beginn der Therapie vor. In diesen Proben konnte ausnahmslos nur die Primärmutation nachgewiesen werden.

In keiner Probe konnte eine Mutation in *KIT* Exon 15 nachgewiesen werden, in einer Probe des Falls B7 gelang die PCR und somit die Sequenzierung von *KIT* Exon 15 nicht. Bei keinem der 24 Patienten mit partieller Remission und Stabilisierung der Erkrankung konnte eine Sekundärmutation in *KIT* Exon 14 oder 15 nachgewiesen werden.

3.4 Sekundärmutationen in Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib und Gruppe WT – Patienten mit einem Wildtyp-GIST

In der Gruppe A gelang die Sequenzierung sowohl von *KIT* Exon 14 als auch von *KIT* Exon 15 in allen Proben. In keiner Probe konnte eine Mutation in *KIT* Exon 14 oder 15 nachgewiesen werden. Auch in der Gruppe der Patienten mit einem Wildtyp-GIST konnte keine Mutation in *KIT* Exon 14 oder 15 gefunden werden, wobei in Fall WT-3 die Sequenzierung von *KIT* Exon 14 und in einer Probe des Falls WT-13 die Sequenzierung von *KIT* Exon 15 trotz mehrfacher Versuche nicht gelang.

Während der Erstellung der hier vorgelegten Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe weitere Sekundärmutationen gefunden und erstbeschrieben, insbesondere p.V654A in Exon 13 und p.Y823D in Exon 17 (Wardelmann et al., 2005; Wardelmann et al., 2006).

3.5 In – Vitro – Mutagenese

Das Ziel des zweiten Teils der hier vorgelegten Arbeit war, die gefundenen Sekundärmutationen in einen passenden Vektor, den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 der Firma Invitrogen, zu klonieren. Ein solches Konstrukt kann im Folgenden in eine humane Zellreihe kloniert werden, um die Resistenz der Mutation gegenüber Imatinib testen zu können und zu belegen, dass die von uns erstbeschriebenen Mutationen überhaupt ursächlich für die Entwicklung einer sekundären Resistenz gegenüber Imatinib sein könnten.

Die Mutagenese gelang für Exon 17 (p.Y823D) ohne zusätzliche Mutation, kloniert in kompetente E.coli XL1 – Blue Zellen lag die DNA in einer Konzentration von 65 µg/ml vor. Bezüglich Exon 13 (p.V654A) war die Mutagenese ebenfalls erfolgreich, als Zusatzmutation lag in Codon 658 statt GGA GGT vor, beide Nukleotide kodieren jedoch für Glycin, so dass auch hiermit weitergearbeitet werden konnte. Die Konzentration konnte mit 73 µg/ml bestimmt werden. Bezüglich Exon 14 (p.T670E) gelang in keinem Klon die Mutagenese, wiederholt kam es zu mehrfacher Primeranlagerung.

Damit c-DNA in humanen Zellen exprimiert werden kann, muss ein eukaryontischer Expressionsvektor verwendet werden. Die Umklonierung des Konstruktes aus dem pBlueskript – Vektor in den pcDNA3.1 – Vektor gelang für Exon 17 (p.Y823D) ohne Begleitmutation, das Konstrukt lag in einer Konzentration von 65 ng/µl vor. Bezüglich der Mutation in Exon 13 (p.V654A) gelang zwar eine Mutagenese, allerdings lag eine zusätzliche Basendeletion vor. Das Konstrukt mit der zusätzlichen Basendeletion lag in einer Konzentration von 704 ng/µl vor. Die Mutagenese von Exon 14 (p.T670E) gelang trotz mehrfacher Versuche nicht.

Zusammenfassend gelang durch die erfolgreiche Klonierung der neu gefundenen Sekundärmutation *KIT* Exon 17 (p.Y823D) in einen eukaryontischen Expressionsvektor die Etablierung eines exemplarischen in – vitro Modells mit Hilfe dessen die Auswirkungen dieser Änderungen weiteruntersucht werden können. Die Klonierung der Mutation in Exon 13 (p.V654A) gelang ebenfalls, allerdings nur mit zusätzlicher Basendeletion, dieses Konstrukt wurde, wie auch das Konstrukt mit der Mutation in Exon 14 (p.T670E) später von der Arbeitsgruppe fertiggestellt.

4. Diskussion

4.1 Nachweis einer bisher nicht beschriebenen Sekundärmutation

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, molekulare Resistenzmechanismen bei GIST unter Therapie mit Imatinib zu detektieren und mögliche Ergebnisse auch funktionell weiter zu charakterisieren.

Tatsächlich konnte bei 2 von 24 Patienten mit fortschreitender Erkrankung unter Therapie mit Imatinib eine neu aufgetretene Mutation in *KIT* Exon 14 nachgewiesen werden. Diese Mutation betraf Codon 670, es kam durch eine doppelte Punktmutation zum Austausch von ACA zu GAA und somit zum Austausch von Threonin durch Glutaminsäure (p.T670E). Diese Mutation war zuvor nicht beschrieben worden und wurde nach ihrer Feststellung publiziert (Wardelmann et al., 2005; Wardelmann et al., 2006). In beiden Fällen war die Neumutation nur in einer von mehreren Metastasen nachweisbar.

Bei den Patienten handelte es sich um einen Mann und eine Frau, beide waren bei Erstdiagnose über 50 Jahre alt. In beiden Fällen lag der Primärtumor im Dünndarm, die Primärmutation betraf im ersten Fall *KIT* Exon 9, im zweiten Fall *KIT* Exon 11. Im ersten Fall wurden nach 10 Monaten, im zweiten Fall nach 60 Monaten Metastasen nachgewiesen und in der Folge eine Therapie mit Imatinib begonnen. Beim ersten Patienten war der Tumor primär resistent, und der Patient verstarb insgesamt 42 Monate nach Diagnosestellung. Der GIST der zweiten Patientin sprach zunächst auf die Therapie an. Sie entwickelte dann jedoch eine sekundäre Progredienz, am Ende des Follow-up (8 Jahre nach Stellung der Erstdiagnose) lebte die Patientin noch.

4.1.1 Sekundärmutation p.T670E als möglicher Resistenzmechanismus

Auch wenn der Austausch von Threonin durch Glutaminsäure bei sekundär resistenten GIST zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht zuvor beschrieben wurde, so war doch der Austausch von Threonin durch Isoleucin an funktionell der gleichen Stelle aus der Resistenzentwicklung der CML bekannt. 2004 wurde von Tamborini et al. diese Mutation erstmals auch bei GIST beschrieben (p.T670I). Threonin spielt in Codon 670 als Ausgangspunkt einer Wasserstoffbrückenbindung eine wichtige Rolle bei der Bindung von Imatinib und wird auch als „gatekeeper“ bezeichnet (Gramza et al., 2009). Von Studien der Resistenzentwicklung der CML ist bekannt, dass der Austausch von Threonin durch Isoleucin diese Wasserstoffbrückenbindung nicht zustande kommen lässt und

Imatinib somit nicht wirken kann (Schindler et al., 2000). Tamborini et al. zeigten 2004, dass p.T670I bei einem GIST auch in vitro zu einer Imatinibresistenz führt. Ob das Nichtzustandekommen der Wasserstoffbrückenbindung oder eine Konformationsänderung die Ursache der Resistenzentwicklung gegen Imatinib erklärt, ist bei der deutlich seltener auftretenden Variante p.T670E nicht geklärt.

Im nächsten Schritt sollte daher in vitro geprüft werden, wie sich GIST mit der neu gefundenen Sekundärmutation verhalten. Mit dem durch die in-vitro-Mutagenese geschaffenen Konstrukt sollte eine Zellreihe geschaffen werden, mit der dieses Verhalten untersucht werden kann.

4.2 Häufigkeit von Sekundärmutationen bei GIST

Im erweiterten Kollektiv der Arbeitsgruppe konnten wir bei 14 von 32 Patienten (44 %) eine Sekundärmutation in *KIT* Exon 13, 14 und 17 nachweisen (Wardelmann et al., 2006). Chen et al. wiesen 2004 erstmals eine Sekundärmutation in einem imatinibresistenten GIST nach. In 6 Tumormanifestationen von 5 Patienten fanden sie eine Sekundärmutation in Exon 13, betroffen war Codon 654, durch eine Punktmutation kam es zum Austausch von Valin zu Alanin. Tamborini et al. beschrieben 2004 eine weitere sekundär entstandene Punktmutation in einem imatinibresistenten GIST. In *KIT* Exon 14 Codon 670 kam es zu einem Austausch von Threonin zu Isoleucin, auch in vitro konnte die Resistenz gegenüber Imatinib bestätigt werden. Debiec-Rychter et al. konnten 2005 Sekundärmutationen bei der Hälfte der untersuchten GIST mit sekundärer Resistenz gegenüber Imatinib nachweisen. p.T670I war auch hier in vitro resistent gegenüber Imatinib, jedoch sensibel gegenüber PKC412 (Midostaurin), einem anderem Tyrosinkinaseinhibitor. Untersuchungen im Rahmen der Phase II Studie B2222 erbrachten sekundäre (Punkt-) Mutationen als Ursache einer sekundären Resistenz bei 67 % der untersuchten GIST, die Daten wurden 2006 von Heinrich et al. veröffentlicht. Im in-vitro Modell führten diese Sekundärmutationen zu einer deutlichen Imatinibresistenz im Vergleich zum Zellkulturmodell ohne sekundäre Mutationen.

Aktuelle Studien weisen in ca. 70 – 80 % der imatinibresistenten Tumormanifestationen Sekundärmutationen nach (Corless et al., 2011; Liegl et al., 2008; Nishida et al., 2008). Die seit den Erstbeschreibungen auch unserer Gruppe steigende Frequenz an nachgewiesenen Sekundärmutationen dürfte dabei in erster Linie auf die neueren sensibleren molekularbiologischen Methoden wie z.B. das „next generation Sequencing“

zurückzuführen sein. Diese Methode erleichtert zudem die molekulargenetische Untersuchung von Gewebe, das durch eine Feinnadelpunktion gewonnen wurde (Gleeson et al., 2015).

4.3 Lokalisation der Sekundärmutationen

Im Gegensatz zu den *KIT* Primärmutationen, die hauptsächlich in Exon 9 und 11, also in der juxtamembranären bzw. der extrazellulären Region liegen und eine Aktivierung des Rezeptors zur Folge haben, betreffen die Sekundärmutationen in Exon 13 und 14, respektive 17 und 18 den Bereich, der die Tyrosinkinasedomänen kodiert.

Exon 13 und 14 kodieren die ATP-Bindungsstelle, an die auch Imatinib bindet. Eine Mutation in dieser Region kann also eine Bindung und damit die Wirkung des Medikaments verhindern. Mutationen in Exon 17 und 18, die die „activation loop“ kodieren, führen zu einer Stabilisierung des Rezeptors in der aktiven Form und verhindern somit eine Bindung von Imatinib (Corless et al., 2011).

Eine Mutation in Exon 15, das für das Kinaseinsert kodiert, konnten wir weder in den Proben vor noch unter Therapie nachweisen. Nach aktueller Literaturlage sind bisher keine Sekundärmutationen in *KIT* Exon 15 beschrieben.

4.4 Vorkommen von Sekundärmutationen in bestimmten Subtypen

Sekundärmutationen treten vor allem bei GIST mit sekundärer Imatinibresistenz auf. In unserem Kollektiv traten Sekundärmutationen bei imatinibresistenten GIST mit Primärmutation in Exon 11 häufiger auf als bei solchen mit Primärmutation in Exon 9 (54,5 % versus 28,6 %) (Wardelmann et al., 2006). Dies beschrieben auch Heinrich et al. 2006 (73 % versus 19 %). Agaram et al. untersuchten 2007 imatinib-sensitive GIST und konnten in einer Tumormanifestation einer Patientin bei insgesamt untersuchten 43 Proben von 28 Patienten eine Sekundärmutation in Exon 13 nachweisen (p.V654A), 23 Monate später entwickelte diese Patientin einen Tumorprogress und eine zweite Sekundärmutation in Exon 14 (p.T670I). Antonescu et al. veröffentlichten 2005 das Auftreten einer Sekundärmutation bei 7 von 15 Patienten, diese GIST hatten als Primärmutation alle eine Exon 11 Mutation. Diesen Zusammenhang bestätigten auch Lee et al. in einer Metaanalyse 2013.

Bisher sind keine Sekundärmutationen bei Wildtyp-GIST gefunden worden (Gounder und Maki, 2011). Auch in unserem Kollektiv von Wildtyp-GIST konnten wir weder bei Patienten

mit imatinibsensiblen GIST noch bei Patienten mit einem primär imatinibresistenten GIST Sekundärmutationen nachweisen. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass die KIT-Aktivierung bei Wildtyp-GIST indirekt über andere Signalwege geschieht und nicht über eine direkte Aktivierung von KIT durch Mutation im *KIT*-Gen (Corless et al., 2011). Hierzu passt die in den vergangenen Jahren zunehmend geklärte Heterogenität dieser Gruppe, einen aktuellen Überblick über die sogenannten Wildtyp-GIST beschreiben Huss et al. 2015. Auch in den seltenen Fällen von GIST ohne immunhistochemische KIT-Rezeptorexpression sind bisher keine Sekundärmutationen gefunden worden (Gramza et al., 2009).

Bei Patienten mit primärer Imatinibresistenz konnten Heinrich et al. 2006 in 10 % der Fälle Sekundärmutationen nachweisen, Antonescu et al. konnten 2005 keine Sekundärmutationen in imatinibsensiblen oder primär resistenten GIST nachweisen.

4.5 Unterschiede dieses Patientenkollektives im Vergleich zu den Daten der Literatur

Im Gegensatz zur Literatur, in der 50 – 60 % der GIST primär im Magen und 20 – 30 % primär im Dünndarm gefunden werden, wurden sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B die meisten GIST dieses Kollektivs primär im Dünndarm gefunden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass GIST mit Primärlokalisierung im Dünndarm häufiger eine schlechtere Prognose haben als GIST mit Primärmutation im Magen (Emory et al., 1999; Miettinen und Lasota, 2001). GIST mit Primärlokalisierung mit Magen sind somit in dieser Arbeit unterrepräsentiert. Bemerkenswert ist das gehäufte Auftreten von extraintestinalen GIST (4 von 24 Fällen) in der Gruppe B. Bezüglich der Primärmutationen fällt auf, dass in diesem Kollektiv keine Fälle mit *PDGFRA*-Mutation vorkommen, dies ist ebenfalls durch den in aller Regel benigneren Verlauf dieser vor allem im Magen vorkommenden GIST zu erklären.

4.6 Nachweis der Sekundärmutationen nur in einzelnen Proben

Auffällig ist, dass die Sekundärmutationen nicht in allen Tumormanifestationen nachweisbar sind. Bei beiden der hier beschriebenen Fälle mit neu aufgetretener Sekundärmutation war diese Mutation nur in einer Metastase nachweisbar, die weiteren Metastasen wiesen einen Wildtyp für Exon 14 auf. Auch im Material des Primärtumors vor Beginn der Therapie im zweiten Fall konnte ein Wildtyp in Exon 14 nachgewiesen werden.

Im Gesamtkollektiv waren die Sekundärmutationen ebenfalls nicht in allen Tumormanifestationen nachweisbar (Wardelmann et al., 2006). Dies deutet darauf hin, dass es in den verschiedenen metastatischen Manifestationen offenbar in unterschiedlichem Ausmaß oder auch gar nicht zur Entwicklung sekundär resistenter Klone kommt. Bei Einsatz einer sensitiveren Methode zur Detektion könnte aber auch in diesem Kollektiv die Zahl der Sekundärmutationen höher sein.

4.7 Mutationstyp

Bei Sekundärmutationen handelt es sich, im Gegensatz zu den Primärmutationen, bei denen Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen vorkommen können, ausschließlich um Punktmutationen. Dies ist auch in den beiden hier angeführten Fällen der Fall, ebenso bei den Sekundärmutationen des Gesamtkollektivs (Wardelmann et al., 2006).

4.8 Polyklonale Sekundärmutationen

Parallel zu dieser Untersuchung von *KIT* Exon 14 und 15 wurde in der gleichen Arbeitsgruppe *KIT* Exon 13 und 17 untersucht, auch in diesen Bereichen konnten Sekundärmutationen nachgewiesen und 2006 veröffentlicht werden (Wardelmann et al., 2006). Bemerkenswert war insbesondere der Nachweis mehrerer Sekundärmutationen in verschiedenen Tumormanifestationen in vier Fällen, ergänzend sei hier die Originaltabelle der Veröffentlichung angeführt:

Tab. 2: Primär- und Sekundärmutationen von 32 GIST unter Therapie mit Imatinib, Wardelmann et al., 2006.

Case no.	No. samples	Primary KIT mutation site	Primary KIT mutation type	Secondary KIT mutation site	Secondary KIT mutation type	No. mutated samples
1	2	Wild-type	-	None	-	-
2	7	Exon 11	K558N,V559_V560del	Exon 17	Y823D	3
3	3	Exon 9	A504_Y505ins	None	-	-
4	5	Exon 11	N567_P573del	Exon 14	S709F	1
5	5	Exon 9	A504_Y505ins	Exon 14	T670I	1
6	2	Exon 11	Q556-,W557T,	K558_V559del	None	-
7	2	Exon 9	A504_Y505ins	None	-	-
8	1	Exon 9	A504_Y505ins	None	-	-
9	4	Exon 11	D579del	Exon 13	V654A	1
10	5	Exon 9	A504_Y505ins	Exon 17	D820G	1
					D816E	1
					D820E	1
					D820Y	1
11	1	Exon 11	V569_L576del	None	-	-
12	3	Exon 11	Q556-,W557_V559del	Exon 14	T670I	2
13	2	Exon 11	W557_K558del	None	-	-
14	2	Exon 11	V559_G565del	None	-	-
15	2	Wild-type	-	None	-	-
16	6	Exon 11	K558_D572del	Exon 13	V654A	1
17	2	Exon 9	A504_Y505ins	None	-	-
18	3	Exon 11	W557_K558del	Exon 14	T670I	1
19	2	Exon 11	M552_W557del	None	-	-
20	6	Exon 11	W557_K558del	None	-	-
21	2	Exon 11	V560del	None	-	-
22	3	Exon 11	E554A,V555_D572del	Exon 13	V654A	1
23	2	Exon 11	P551_E554del	None	-	-
24	3	Wild-type	-	None	-	-
25	2	Exon 11	V560D	None	-	-
26	7	Exon 11	V560D	Exon 13	V654A	4
27	5	Exon 11	W557_K558del	Exon 14	T670I	1
				Exon 13	V654A	1
				Exon 14	T670E	2
28	3	Exon 11	W557G	Exon 17	Y823D	2
29	3	Exon 11	E554del	Q556_W558del	Exon 13	V654A
30	7	Exon 9	A504_Y505ins	None	-	-
31	1	Exon 11	W557_E562del	Exon 17	N822K	1
32	1	Exon 11	W557_E561del	Exon 13	V654A	1

Interessanterweise konnte in einer später von der Arbeitsgruppe untersuchten Probe der zweiten Patientin mit Sekundärmutation p.T670E eine zweite Sekundärmutation in Exon

13 (p.V654A) in einer unter Therapie mit Imatinib progredienten Lebermetastase nachgewiesen werden.

Auch Liegl et al. beschrieben 2008 in ihrer Studie die Heterogenität der Sekundärmutationen und somit die individuelle klonale Entwicklung der Tumormanifestationen. So konnten sie in 9 von 11 Patienten (83 %) mit progressivem GIST unter Therapie mit Imatinib oder Sunitinib und Primärmutation in *KIT* Sekundärmutationen in *KIT* nachweisen. Bei 6 Patienten (67 %) konnten 2 bis 5 verschiedene Sekundärmutationen in verschiedenen Metastasen nachgewiesen werden, 3 Patienten (34 %) wiesen 2 Sekundärmutationen in derselben Metastase auf. Sekundärmutationen in Wildtyp-GIST fand auch diese Arbeitsgruppe nicht.

4.9 Entstehen die Sekundärmutationen neu oder wächst der Tumor aufgrund einer Selektion durch die Therapie?

Es stellt sich die Frage, ob die Sekundärmutationen unter Therapie neu entstehen oder bereits vor Therapie in einigen Zellen vorbestehen und diese Zellen durch die Therapie selektioniert zu einem Wachstum des Tumors führen.

Grundsätzlich besteht der Eindruck, dass die Zahl der Fälle mit Sekundärmutation mit zunehmender Therapiedauer kontinuierlich weiter steigt. Da Exon 11 mutierte GIST zu meist länger stabilisierbar sind, wäre ihr Risiko neu auftretender weiterer Mutationen dann höher als das für GIST mit anderen Mutationen. Andererseits weisen GIST mit geringerem Ansprechen auf Imatinib, also zum Beispiel solche mit Primärmutation in *KIT* Exon 9, unter Therapie mehr Tumorzellen auf. Die vermehrte Anzahl von Zellen könnte das Risiko der Entwicklung einer Sekundärmutation ebenfalls erhöhen (Wardelmann et al., 2006). Allerdings lassen sich beide Thesen nicht durch Daten belegen.

Alternativ ist denkbar, dass bereits initial einige Tumorzellen zusätzlich zur Primärmutation eine zweite Mutation aufweisen, die ohne Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren aber keinen Wachstumsvorteil darstellen. Unter Therapie käme es zu einer Selektion der Zellen mit zwei Mutationen. Allerdings konnten bisher in keinem Primärtumor mehrere oder mindestens zwei *KIT* Mutationen nachgewiesen werden. Es kann naturgemäß nicht ausgeschlossen werden, dass dies auf eine zu geringe Sensitivität der verwendeten Methoden zurückzuführen ist, so dass die nur sehr geringe Anzahl doppelt mutierter Tumorzellen nicht detektiert werden kann. In einer aktuellen Publikation konnten Heydt et al. mittels „next generation sequencing“ im Bonner Kollektiv keine resistente

Sekundärmutation im Primärtumor nachweisen, was die Theorie der Entstehung der Sekundärmutation unter der Therapie stützt. Allerdings ist natürlich auch die Sensitivität des „next generation sequencing“ begrenzt (Heydt et al. 2015).

Desai et al. beschrieben 2007 bei 23 von 48 Patienten mit progressivem GIST unter Therapie mit Imatinib im CT/MRT/PET-Scan neu anreichernde Regionen in vorher bekannten Tumormassen („nodules within a mass“). Diese Läsionen traten im Median nach 5 Monaten (Spannweite 0 bis 13 Monaten) auf. Bei 18 Patienten gingen diese Neuanreicherungen einem objektivierbaren Tumorprogress voraus. Bei 10 Patienten konnten diese Läsionen biopsiert und mit dem Primärtumor verglichen werden, bei 8 Patienten konnten neu aufgetretene Sekundärmutationen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung spricht für eine Selektion einzelner Tumorzellen mit Sekundärmutation durch die Therapie. Die Autoren folgerten zudem daraus, dass bereits diese neu anreichernden Läsionen als Tumorprogress zu werten sind, auch wenn die Gesamtläsion hierdurch noch nicht an Größe zugenommen hat.

4.10 Einfluss der Sekundärmutationen auf den klinischen Verlauf

Die geringe Anzahl von Fällen mit Sekundärmutationen lässt in dieser Arbeit mit nur 2 Sekundärmutationen keine Aussage auf einen möglichen Einfluss der Neumutation auf den klinischen Verlauf zu. Im Gesamtkollektiv der Patienten ergaben sich jedoch Hinweise, dass GIST mit Sekundärmutation in *KIT* Exon 14 einen aggressiveren Verlauf aufweisen (Wardelmann et al., 2006). Aufgrund des Auftretens mehrerer Sekundärmutationen in verschiedenen Metastasen und zum Teil sogar in verschiedenen Regionen einer Metastase eines Patienten ist eine routinemäßige Bestimmung möglicher Sekundärmutationen bei Patienten mit metastasiertem GIST aktuell nicht empfohlen, da von einem erheblichen Stichprobenfehler ausgegangen werden muss (Corless et al., 2011; Liegl et al., 2008; Wardelmann et al., 2005).

4.11 Alternative Resistenzmechanismen

Neben diesen Sekundärmutationen müssen weitere Wege der Resistenzentwicklung diskutiert werden. So berichten Liegl et al. 2008 von 2 imatinibresistenten Läsionen, in denen eine Amplifikation von *KIT* nachweisbar war, aber keine Sekundärmutation.

Bei einer Minderheit der sekundär resistenten GIST kann im Verlauf keine KIT Expression mehr nachgewiesen werden, dies kann durch eine „Umschaltung“ auf alternative

Signalwege erklärt werden. So konnten Mahadevan et al. 2007 bei zwei Patienten mit KIT-negativen GIST immunhistochemisch eine Expression von AXL, einer weiteren Tyrosinkinase, nachweisen. In vitro bestätigte sich in einer imatinibresistenten Zellreihe die Überexpression der Tyrosinkinase AXL bei gleichzeitiger Herunterregulation von KIT. AXL reguliert dieselben Signalwege wie KIT, der Mechanismus bei GIST ist bisher unklar (Gramza et al., 2009).

Sakurama et al. zeigten 2009 in einer imatinibresistenten Zellreihe mit *KIT* p.D820Y Mutation in Exon 17 eine fortbestehende FAK (focal adhesion kinase) und AKT Aktivität, die in einer *KIT* Exon 11 mutierten imatinibsensiblen Zellreihe nicht nachweisbar war. Sowohl in vitro als auch in vivo in einem Xenograft-Mausmodell führte die Behandlung mit einem FAK-Inhibitor zum Zelltod.

Agaram et al. konnten 2008 eine *BRAF* p.V600E Mutation in einer Imatinib-resistenten Metastase nachweisen. Die Therapie mit BRAF-Inhibitoren, wie sie bei malignen Melanomen erfolgt, kann daher bei nachgewiesener Mutation im Einzelfall erwogen werden (Agaimy et al., 2009; Agaram et al., 2008).

Dies zeigt, dass die molekularpathologische Diagnostik auch bei einem resistenten GIST entscheidende Hinweise für die weitere Therapie geben kann.

4.12 Alternative Therapiemöglichkeiten

Die Bestimmung der Sekundärmutationen kann sowohl für die weitere medikamentöse Therapie von entscheidender Bedeutung sein, vor allem aber auch für die Entwicklung weiterer neuer Therapieansätze. Da nur wenige Patienten mit imatinibresistenten GIST auf eine Dosiserhöhung reagieren, wurden in der Zwischenzeit in mehreren Studien alternative Tyrosinkinaseinhibitoren zur Therapie imatinibresistenter GIST auch in Bezug auf die Wirksamkeit bei Sekundärmutationen untersucht.

Besonders zu nennen ist hier Sunitinib. Wie auch Imatinib bindet Sunitinib an der inaktiven Tyrosinkinasedomäne und verhindert das Binden von ATP. Neben KIT und PDGFRA hemmt Sunitinib noch weitere Tyrosinkinasen, insbesondere den Rezeptor des vascular endothel growth factor (VEGF1, VEGF, VEGF3). Diese Hemmung kann durch den negativen Einfluss auf die Gefäßproliferation eine unterstützende therapeutische Wirkung haben (Mendel et al., 2003). Eine Multicenter Phase III Studie mit 312 Patienten mit fortgeschrittenem GIST aus den Jahren 2003 – 2005 ergab bei 207 Patienten, die 50 mg Sunitinib in einem 6-Wochen-Zyklus (4 Wochen ON, 2 Wochen OFF) erhielten,

eine Zeitspanne bis zum Tumorprogress von im Median 26 Wochen, im Vergleich zur Placebogruppe mit 6 Wochen. Nebenwirkungen (Fatigue, Diarrhoe, Pigmentierungsstörungen, Hauterscheinungen, Übelkeit, Appetitminderung, Hand-Fuß-Syndrom) wurden häufig, aber in milder Ausprägung beschrieben. Zudem können Leuko- und Thrombozytopenien auftreten (Demetri et al., 2006). Sunitinib wurde 2006 für Patienten mit imatinibresistentem GIST oder bei Imatinibunverträglichkeit von der FDA als Zweitlinientherapie zugelassen.

Allerdings sprechen nicht alle imatinibresistenten GIST auf Sunitinib an, auch hier scheint es eine Abhängigkeit von der Molekulargenetik der Tumoren zu geben (s. Abb. 14). Weitere Tyrosinkinaseinhibitoren sind Sorafenib und Nilotinib. Bedingt durch eine vermehrte zelluläre Aufnahme führt eine Therapie mit Nilotinib zu einer 7- bis 10-fach höheren intrazellulären Konzentration im Vergleich zu Imatinib oder Sunitinib (Kim und Zalupski, 2011). Auch bei diesen Medikamenten zeigen sich einige GIST in Abhängigkeit ihrer Mutationen resistent, wie Corless et al. 2011 anschaulich zeigten.

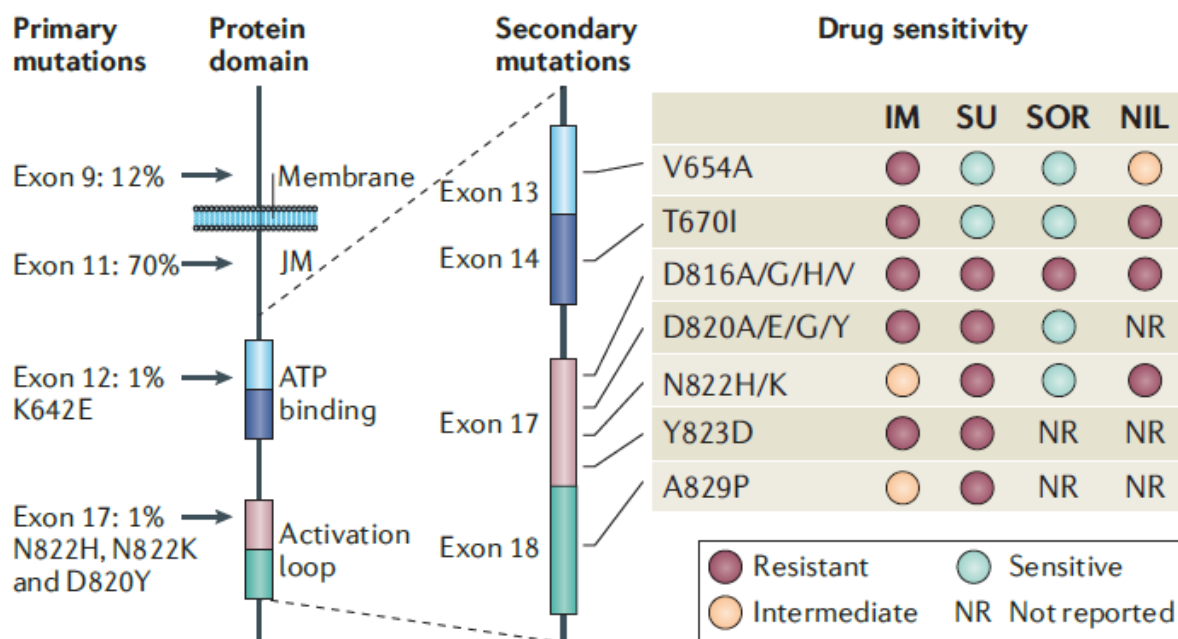


Abb. 14: Sekundärmutationen in KIT und ihr in-vitro Ansprechen auf Imatinib (IM), Sunitinib (SU), Sorafenib (SOR) und Nilotinib (NIL). JM-juxtamembranärer Bereich, aus Corless et al., 2011.

Nachdem Demetri et al. 2013 die Ergebnisse einer Phase III Studie (GRID) veröffentlichten, in der Patienten mit imatinib- und sunitinibresistenten GIST von Regorafenib

profitierten (das Intervall bis zum Tumorprogress betrug in der Regorafenib-Gruppe 4,8 Monate, in der Placebogruppe 0,9 Monate), wurde Regorafenib von der FDA als thirdline Therapie bei imatinib- und sunitinibresistenten GIST zugelassen. Als Nebenwirkung traten vor allem arterielle Hypertension, das Hand-Fuß-Syndrom und eine Diarrhoe auf (Demetri et al., 2013). In den letzten Jahren wurde bei Patienten, deren GIST initial auf Imatinib angesprochen hat, eine erneute Gabe von Imatinib als thirdline Therapie vor allem in Palliativ-Situationen nach Resistenzentwicklung auf Imatinib und Sunitinib versucht. Dies führte zu einer signifikanten Verlängerung des progressfreien Intervalls, das Gesamtüberleben wurde nicht beeinflusst (Kang et al., 2013). Weitere Tyrosinkinaseinhibitoren werden aktuell erforscht.

Letztlich scheinen die Therapieerfolge der Monotherapien mittels Tyrosinkinaseinhibitoren bei GIST durch die sekundäre Resistenzentwicklung infolge von Sekundärmutationen limitiert zu sein. Für die Zukunft wäre eine Kombination aus verschiedenen Tyrosinkinaseinhibitoren, die sowohl die inaktive (wie Imatinib) als auch die aktive Form von KIT binden können, interessant, diese Kombinationen sind aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen bislang aber nicht etabliert. Alternativ zur Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren, wurden einige andere Strategien erprobt, so zum Beispiel eine Therapie mit Heat-shock-Protein-Inhibitoren. Diese stabilisieren Proteine wie den KIT-Rezeptor und schützen sie vor proteosomaler Degradation. Nach anfänglich guten Ergebnissen (Wagner et al., 2008) wurden die nachfolgenden Studien aufgrund von Nebenwirkungen aber auch Wirkungslosigkeit geschlossen (Marrari et al., 2012). Eine aktuelle Publikation zeigte ein Ansprechen der GIST auf den oralen HSP-Inhibitor BIIB021 bei 43 % der 36 Patienten einer Phase II Studie. Die Nebenwirkungen wurden als mild bis moderat beschrieben (Dickson et al., 2013).

Ein weiterer Mechanismus besteht in der Hemmung der von KIT oder PDGFRA abhängigen Signalkaskaden wie P13K, AKT oder mTOR. Präklinische Daten zeigen hier einen Synergismus zwischen Tyrosinkinaseinhibitoren und Inhibitoren der PI3K-Kaskade (Floris et al., 2013), klinische Studien hierzu sind noch nicht abgeschlossen. Eine aktuelle Übersicht der Therapiemöglichkeiten und der Studien publizierten Serrano und George 2014 sowie Abdel-Rahman und Fouad im Juni 2015.

5. Zusammenfassung

GIST sind die häufigsten mesenchymalen Tumoren des Gastrointestinaltrakts. 1998 wiesen Hirota et al. erstmals Mutationen in *KIT* nach. Aktuell geht man davon aus, dass etwa 80 % der GIST eine aktivierende Mutation in *KIT* aufweisen. Nachdem Joensuu et al. 2001 eindrücklich die Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib bei einer Patientin mit fortgeschrittenem metastasierten GIST beschrieben und die folgenden Phase II und III Studien diese Wirkung bestätigten, ist Imatinib mittlerweile die Therapie der 1. Wahl bei inoperablen oder metastasierten GIST. Das mediane Überleben lag bei rein chirurgischer Therapie bei ca. 18 Monaten, durch die medikamentöse Therapie erhöhte sich das mediane Überleben auf ca. 50 Monate (Blanke et al., 2008). Ca. 40 bis 50 % der GIST entwickeln innerhalb der ersten 2 Jahre nach Therapiebeginn eine sekundäre Resistenz gegenüber Imatinib (Heinrich et al., 2008).

Es werden verschiedene Ursachen der Resistenzentwicklung diskutiert. Ziel dieser Arbeit war die Suche nach Sekundärmutationen bei GIST, die, analog zu Mechanismen der Resistenzentwicklung bei der Therapie einer CML mit Imatinib, eine solche Imatinib-resistenz erklären können. Hierfür wurden aus dem Kollektiv der GIST-Patienten des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn sowie eingesandter Referenzfälle Tumorproben von Patienten mit fortgeschrittenem GIST, die vor und während der Therapie mit Imatinib hauptsächlich im Rahmen einer Operation gewonnen wurden, auf Sekundärmutationen in *KIT* untersucht. Als mögliche „Hot Spot“ Regionen wurden Exon 14, das die 1. Tyrosinkinase kodiert und Exon 15, das das Kinaseinsert des KIT-Rezeptors kodiert, untersucht.

Bei 2 von insgesamt 69 Patienten mit fortgeschrittenem GIST unter Therapie mit Imatinib konnte in je einer Metastase eine Sekundärmutation in Exon 14 des KIT-Rezeptors nachgewiesen werden. Diese Mutation (p.T670E) wurde bisher weder als Sekundär- noch als Primärmutation beschrieben. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Mutation in vitro mittels Klonierung in einen eukaryontischen Expressionsvektor eingefügt. Somit erfolgte ein erster Schritt zur in vitro Validierung der neu gefundenen Sekundärmutation T670E in *KIT* als Ursache für eine Imatinibresistenz bei GIST. Dieses Modell ist hervorragend geeignet, die Wirksamkeit neuer Tyrosinkinaseinhibitoren oder andere medikamentöse Ansätze zur Behandlung sekundär resistenter GIST zu testen.

6. Anhang

6.1 Klinische Daten

Tab. 3: Klinische Daten Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

Fall	M/W	Alter	Untersuchtes Gewebe, n (Proben)	Lokalisation Primärtumor	Größe [cm] Primärtumor	Histologische Charakteristika Primärtumor	Mitosen pro 50 HPF Primärtumor	Rückfallrisiko nach Miettinen 2006*
A-1	W	45	PT (1)	Magen	16,0	Gem	18	Hoch
A-2	M	41	PT (1)	Dünndarm	KA	Sp	6	KA
A-3	W	56	PT (1)	Dünndarm	6,0	Sp	19	Hoch
A-4	M	79	PT (1)	Dünndarm	15,0	Gem	14	Hoch
A-5	M	51	PT (1)	Magen	21,0	Sp	42	Hoch
A-6	M	61	PT (1)	Ösophagus	8,0	Gem	13	Hoch
A-7	M	57	PT (1)	Dünndarm	11,1	Sp	4	Hoch
A-8	M	41	PT (1)	Dünndarm	17,0	Sp	4	Hoch
A-9	W	52	PT (1)	Dünndarm	5,0	Sp	0	Gering
A-10	W	45	PT (1)	Dünndarm	6,0	Gem	0	Intermediär
A-11	M	62	PT (1)	Dünndarm	2,0	Sp	1	Gering
A-12	W	58	PT (1)	Magen	7,0	Sp	30	Hoch
A-13	W	70	PT (1)	Dünndarm	14,0	Sp	3	Hoch
A-14	M	66	PT (1)	Magen	5,0	Sp	12	Intermediär
A-15	M	57	PT (1)	Magen	5,5	Epi	34	Hoch

A-16	M	62	Metastase (1)	Magen	25	Gem	PT: 60	Hoch
A-17	M	26	PT (1)	Magen	8,0	Sp	0	Gering
A-18	W	63	PT (1)	Magen	KA	Epi	0	KA
A-19	W	77	PT (1)	Linke Flexur	12,0	Sp	0	Hoch
A-20	W	64	PT (2)	Dünndarm	12,8	Sp	3	Hoch
A-21	W	68	PT (1)	Dünndarm	13,0	Sp	12	Hoch
Fall	M/W	Alter	Untersuchtes Gewebe, n (Proben)	Lokalisation Primärtumor	Größe [cm] Primärtumor	Histologische Charakteristika Primärtumor	Mitosen pro 50 HPF Primärtumor	Rückfallrisiko nach Miettinen 2006*
A-22	M	53	PT (2)	Dünndarm	KA	Sp	2	KA
A-23	W	72	PT (1)	Peritoneum	9,0	Gem	16	KA
A-24	W	65	Rezidiv (1)	KA	KA	Sp	12	KA
A-25	W	65	PT (1)	Magen	5,5	Gem	18	Hoch
A-26	M	73	PT (1)	Dünndarm	18	Sp	6	Hoch

*bezogen auf den Primärtumor

M-männlich, W-weiblich, PT-Primärtumor, Met-Metastase, KA-keine Angabe, Gem-gemischter Subtyp, Sp-spindelzelliger Subtyp, Epi-epitheloider Subtyp

Tab. 4: Verlauf und Primärmutation Gruppe A – Patienten vor Therapie mit Imatinib

Fall	Zeit bis zum Progress [Monate]	Lokalisation der Metastase/ des Rezidivs	Ansprechen auf Imatinib/ Dauer des Ansprechens bis zum Ende des Follow-up [Monate]		Outcome	Primärmutation	
A-1	17	Leber	PD	0	DOD ¹	WT	-
A-2	48	Leber	PR	21	KA	Exon 11	p.Q556_D572del
A-3	9	Leber	PR	27	KA	Exon 11	p.V560D
A-4	3	Leber	PR	28	KA	Exon 11	p.N564_L576del
A-5	0	Leber, Peritoneum	PR	27	KA	Exon 11	p.Q556_L563del
A-6	0	Leber	SD	26	KA	Exon 11	p.W557_K558del
A-7	12	Leber, Peritoneum	PR	27	KA	WT	-
A-8	8	Leber, Peritoneum, Rezidiv	SP	15	DOD ²	WT	-
A-9	0 11	Peritoneum, Leber	SP	16	KA	Exon 9	p.A504_Y505ins
A-10	31	Leber	PR	21	KA	Exon 11	p.K550-K558del
A-11	11	Leber	SP	25	KA	Exon 13	p.K642E
A-12	27	Leber, Peritoneum, Knochen	SD	24	KA	Exon 11	p.K558-V560del
A-13	29	Leber	SD	23	KA	Exon 9	p.A504_Y505ins
A-14	17	Leber, Rezidiv	PR	22	KA	Exon 11	p.V560D
A-15	0	Leber	PR	14	KA	Exon 11	p.V560D
A-16	25	Peritoneum	PR	26	KA	WT	-
A-17	36	Rezidiv	PD	0	KA	WT	-

Fall	Zeit bis zum Progress [Monate]	Lokalisation der Metastase/ des Rezidivs	Ansprechen auf Imatinib/ Dauer des Ansprechens bis zum Ende des Follow-up [Monate]		Outcome	Primärmutation	
A-18	10	Rezidiv, Peritoneum	PR	23	KA	WT	-
A-19	-**	Kein Progress	PR	29	KA	Exon 11	p.V560G
A-20	17	Leber	SD	28	KA	Exon 11	p.Q556H, p.W557_D572del
A-21	10	Peritoneum, Rezidiv	CR	23	KA	Exon 9	p.A504_Y505ins
A-22	42	Leber	PD	0	DOD ³	WT	-
A-23	KA	KA	PR	48	KA	Exon 11	p.K550L, p.P551_V555del
A-24	KA	Rezidiv	PR	16	KA	Exon 13	p.K642E
A-25	8	Rezidiv	SP	21	KA	Exon 11	p.W557_K558del
A-26	0	Peritoneum	SP	20	KA	Exon 11	p.W557G

KA-Keine Angabe, CR-complete response, PR-partial response, SD-stable disease, SP-secondary progress, PD-progressive disease; DOD-Died of disease

* A10 Erstdiagnose Leiomyosarkom, Zustand nach R0 Resektion; ** A19 primär inoperabel

¹ 22 Monate nach Erstdiagnose; ² 23 Monate nach ED; ³ 60 Monate nach ED

Tab. 5: Klinische Daten Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

Fall	M/W	Alter	Untersuchtes Gewebe n (Proben)	Lokalisation Primärtumor	Größe [cm] Primärtumor	Histologische Charakteristika Primärtumor	Mitosen pro 50 HPF Primärtumor	Rückfallrisiko nach Miettinen 2006*
B-1	M	50	Metastase (2)	Magen	KA	KA	KA	KA
B-2	M	46	Rezidiv (1)	Peritoneum	KA	KA	KA	KA
B-3	M	56	Metastase (4)	Peritoneum	8,0	KA	KA	KA
B-4	W	38	Metastase (2)	Dünndarm	KA	KA	KA	KA
B-5	M	57	Metastase (3)	Ileum	16	KA	KA	KA
B-6	M	42	Metastase (6)	Dünndarm	15	KA	KA	KA
B-7	M	56	Metastase (5)	Ileum	15	KA	KA	KA
B-8	M	54	Metastase (1)	Rektum	11	KA	KA	KA
B-9	M	60	Rezidiv (1)	Dünndarm	15	KA	KA	KA
B-10	M	56	Rezidiv (1)	Rektum	KA	KA	KA	KA
B-11	W	40	KA (1)	KA	KA	KA	KA	KA
B-12	M	60	PT (1), Metastase(1) ¹	Magen	18	Gem	15	Hoch
B-13	M	60	PT (1), Metastase (1)	Jejunum	6,0	Sp	8	Hoch
B-14	W	43	PT (1), Metastase (1)	Jejunum	20,0	Sp	2	Hoch
B-15	M	58	PT (1), Rezidiv (2), Metastase (3)	Dünndarm	5,5	Sp	2	Intermediär
B-16	M	59	PT(1), Metastase (1)	Dünndarm	7,0	Sp	36	Hoch
B-17	M	57	PT, vor Therapie (1), nach Therapie (5) ²	Peritoneum	14,0	Sp	16	Hoch

Fall	M/W	Alter	Untersuchtes Gewebe n (Proben)	Lokalisation Primärtumor	Größe [cm] Primärtumor	Histologische Charakteristika Primärtumor	Mitosen pro 50 HPF Primärtumor	Rückfallrisiko nach Miettinen 2006*
B-18	W	67	PT(1), Metastase(1)	Dünndarm	KA	Sp	1	KA
B-19	W	68	PT (1), Metastase (2)	Dünndarm	7,0	Sp	11	Hoch
B-20	M	59	PT (1), Metastase (4)	Ileum	KA	Sp	135	Hoch
B-21	M	72	PT (1), Metastase (1)	Jejunum	8,0	Sp	10	Hoch
B-22	W	56	PT (1), Metastase (1)	Peritoneum	11,0	Sp	135	Hoch
B-23	w	56	Metastase (5)	Peritoneum	KA	KA	KA	KA
B-24	M	53	PT (1), Metastase (1)	Magen	15,0	Sp	110	Hoch

M-männlich, W-weiblich, HPF-high power field, PT-Primärtumor, KA-keine Angabe, Sp-spindelzelliger Subtyp, Epi-epitheloider Subtyp, Gem-gemischter Subtyp

* bezogen auf den Primärtumor

¹Sektion; ²primär inoperabel

Tab. 6: Verlauf und Primärmutation Gruppe B – Patienten unter Therapie mit Imatinib

Fall	Zeit bis zum Progress [Monate]	Lokalisation der Metastase/ des Rezidivs	Ansprechen auf Imatinib/ Dauer des Ansprechens bis zum Ende des Follow-up [Monate]		Out-come	Primärmutation	
B-1	0	Peritoneum Duodenum	PD	0	DOD (5)	WT	-
B-2	10 12	Leber Lokalrezidiv	SP	24	AWD (62)	Exon 11	p.M552_W557del
B-3	0	Peritoneum	SP	24	DOD (48)	Exon 11	p.K558N, p.V559_V560del
B-4	22 72	Rezidiv Peritoneum	SP	4	DOD (117)	Exon 9	p.A504_Y505ins
B-5	24 26	Peritoneum Leber	SP	16	AWD (59)	Exon 11	p.E554del, Q556_W558del
B-6	6	Leber	SP	15	DOD (48)	KA	
B-7	10	Peritoneum	PD	0	DOD (42)	Exon 9	p.A504_Y505ins
B-8	108	Leber	SP	19	DOD (132)	Exon 11	p.Q556H, p.W557T, p.K558_559del
B-9	39	Leber	SP	25	DOD (107)	Exon 9	p.A504_Y505ins
B-10	24 70	Rezidiv, Peritoneum	SD	45	AWD (144)	Exon 9	p.A504-Y505ins
B-11	5, 16, 21, 28	Rezidiv	PR	25	AWD (51)	Exon 11	p.V569-L576del
B-12	0	Leber	PR	11	DOD ¹ (30)	Exon 11	p. W557_K558del
B-13	24	Leber	SP	16	DOD (62)	Exon 11	p.V559_G565del
B-14	0 9	Peritoneum Leber	PR	24	AWD (25)	WT	-
B-15	13	Rezidiv, Leber	SP	13	DOD (56)	Exon 11	p.K558_D572del
B-16	4	Leber	SP	20	DOD (36)	Exon 9	p.A504_Y505ins

Fall	Zeit bis zum Progress [Monate]	Lokalisation der Metastase/ des Rezidivs	Ansprechen auf Imatinib/ Dauer des Ansprechens bis zum Ende des Follow-up [Monate]		Out-come	Primärmutation	
B-17		keine	SP	12	DOD (40)	Exon 11	p.W557_K558del
B-18	0	Peritonum	SP	15	DOD (62)	Exon 11	p.V560del
B-19	6	Peritoneum	SP	19	DOD (45)	Exon 11	p.E554A, p.V555_P573del
B-20	84	Leber, Peritoneum	SP	10	DOD (111)	Exon 9	p.A504_Y505ins
B-21	0	Leber	SP	20	DOD (30)	WT	-
B-22	4 36	Rezidiv Lunge	PR	17	AWD (45)	Exon 11	p.V560D
B-23	60	Peritoneum	SP	24	AWD (96)	Exon 11	p.V560D
B-24	6	Peritoneum	SP	18	AWD (40)	Exon 11	p.W557_K558del

Mon-Monate, KA-Keine Angabe, CR-complete response, PR-partial response, SD-stable disease, SP-secondary progress, PD-progressive disease; DOD-Died of disease, AWD-alive with disease

¹verstorben aufgrund einer Perforation einer regressiven zystischen Tumormetastase in das Perikard

Tab. 7: Klinische Daten Gruppe WT – Patienten mit einem Wildtyp-GIST

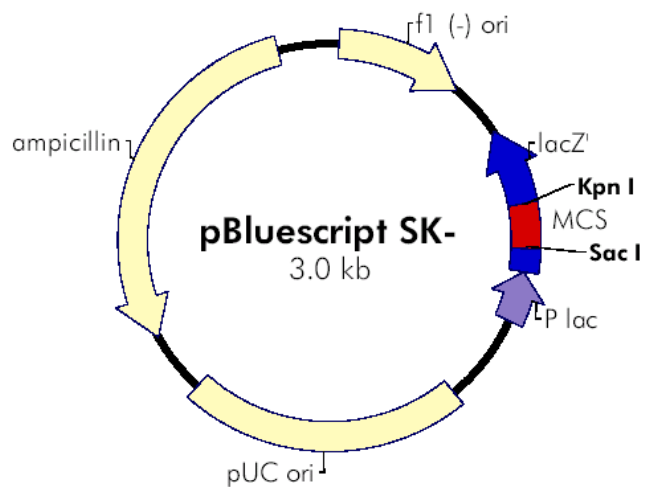
Fall	M/W	Alter	Untersuchtes Gewebe; n (Proben)	Lokalisation Primärtumor	Größe [cm] Primärtumor	Histologische Charakteristika Primärtumor	Mitosen pro 50 HPF Primärtumor	Dignität nach Miettinen 2006*
WT-1	M	62	PT (1)	Magen	2,5	Sp	1	sehr gering
WT-2	M	51	PT (1)	Magen	7,0	Epi	0	gering
WT-3	W	83	PT (2)	Ösophagus	0,1	Sp	0	kein Risiko
WT-4	W	67	PT (1)	Duodenum	13,0	KA	0	hoch
WT-5	M	55	PT (3)	Magen (multipel)	0,3	Sp	0	kein Risiko
WT-6	M	45	PT (1)	Magen	4,0	KA	0	sehr gering
WT-7	M	76	PT (1)	Magen	3,2	Sp	0	sehr gering
WT-8	W	83	PT (1)	Dünndarm	0,6	Sp	0	kein Risiko
WT-9	M	83	PT (1)	Magen	1,8	KA	0	kein Risiko
WT-10	M	78	PT (1)	Magen	0,4	Sp	0	kein Risiko
WT-11	W	58	PT (1)	Magen	2,0	Gem	1	kein Risiko
WT-12	W	31	PT (1)	Magen	6,5	KA	32	hoch
WT-13	W	60	PT (2)	Dünndarm	8,0	Sp	0	intermediär
WT-14	W	68	PT (1)	Magen	22,0	Epi	7	hoch
WT-15	W	73	PT (2)	Magen	KA	Gem	50	KA
WT-16	W	77	PT (1)	Magen	11	Sp	2	intermediär
WT-17	M	14	PT (1)	Dünndarm	1,2	Sp	0	kein Risiko
WT-18	W	42	Primärtumor (1)	Dünndarm	10,0	Gem	1	intermediär
WT-19	M	60	Primärtumor (1)	Magen	5,0	Sp	0/25	KA

W-weiblich, M-Männlich, HPF-high power field, KA-Keine Angabe, Sp-spindelzelliger Subtyp, Epi-epitheloider Subtyp, Gem-gemischter Subtyp

* bezogen auf den Primärtumor

6.2 Vektorkarten

f1 (-) origin 24–330
 β -galactosidase α -fragment 463–816
multiple cloning site 653–760
lac promoter 817–938
pUC origin 1158–1825
ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976–2833



pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 601–826)

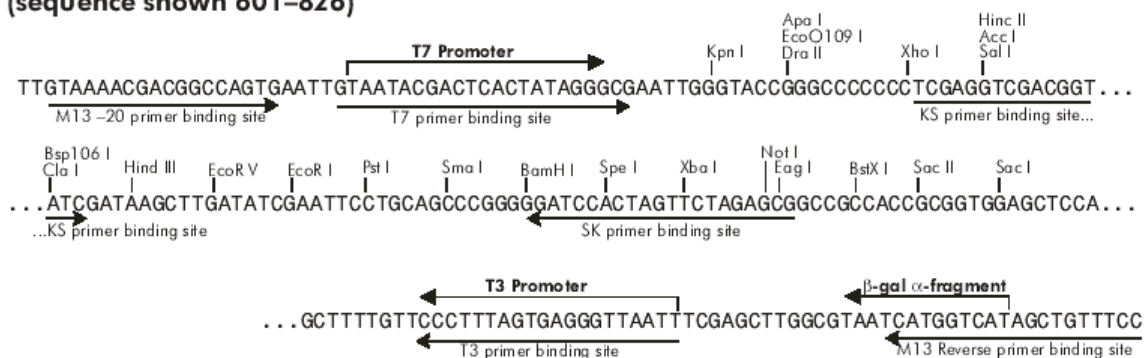


Abb. 15: Vektorkarte und Multiple Cloning Site Plasmid pBluescript.

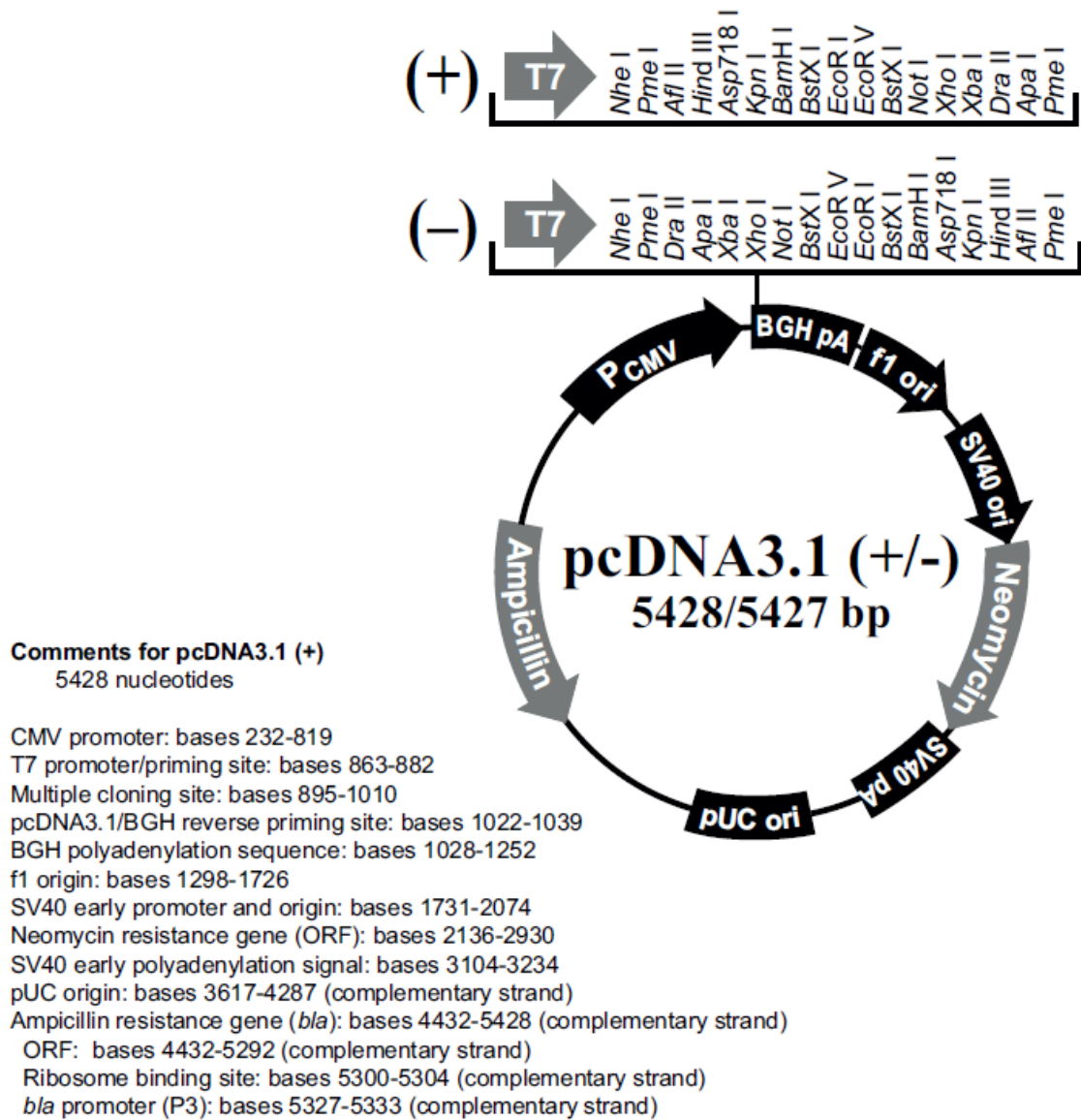


Abb. 16: Vektorkarte pcDNA3.1.

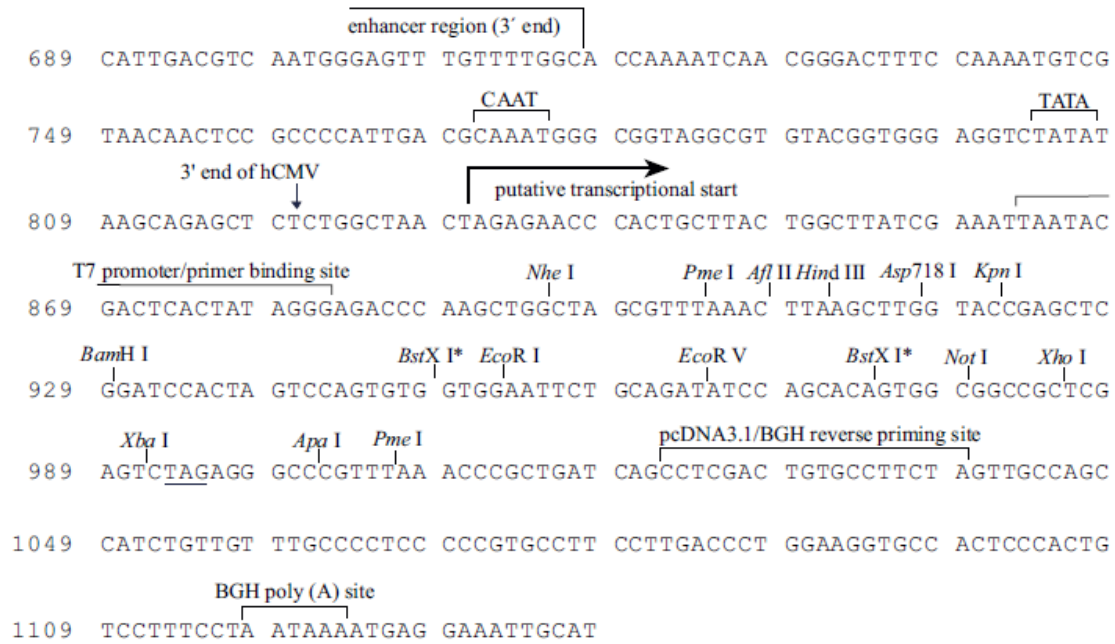


Abb. 17: Multiple cloning site pcDNA3.1+4

7. Literaturverzeichnis

- Abdel-Rahman O, Fouad M. Systemic therapy options for advanced gastrointestinal stromal tumors beyond first-line imatinib: a systematic review. *Future Oncol*. 2015; 11: 1829–1843
- Afrin LB, Cichocki F, Patel K, Molderings GJ. Successful Treatment of Mast Cell Activation Syndrome with Sunitinib. *Eur J Haematol* 2015; 95: 595–597
- Agaimy A, Terracciano LM, Dirnhofer S, Tornillo L, Foerster A, Hartmann A, Bihl MP. V600E BRAF mutations are alternative early molecular events in a subset of KIT/ PDGFRA wild-type gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2009; 62: 613–616
- Agaram NP, Besmer P, Wong GC, Guo T, Socci ND, Maki RG, DeSantis D, Brennan MF, Singer S, DeMatteo RP, Antonescu CR. Pathologic and molecular heterogeneity in imatinib-stable or imatinib-responsive gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 170–181
- Agaram NP, Wong GC, Guo T, Maki RG, Singer S, Dematteo RP, Besmer P, Antonescu CR. Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naïve and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 853–859
- Akiyama K, Numaga J, Kagaya F, Takazawa Y, Suzuki S, Koseki N, Kato S, Kaburaki T, Kawashima H. Case of optic nerve involvement in metastasis of a gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Ophthalmol* 2004; 48: 166–168
- Anagnostoulis S, Mimidis K, Papadopoulos V, Papalazarou D, Argyropoulou P, Iakovidis C, Polychronidis A, Karayiannakis A, Filippou DK, Simopoulos C. Subcutaneous metastasis from a gastrointestinal stromal tumor of the stomach: a case report. *J BUON* 2007; 12: 549–552
- Andersson J, Sihto H, Meis-Kindblom JM, Joensuu H, Nupponen N, Kindblom LG. NF1-associated gastrointestinal stromal tumors have unique clinical, phenotypic, and genotypic characteristics. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1170–1176
- Antonescu CR, Viale A, Sarraf L, Tschernyavsky SJ, Gonen M, Segal NH, Maki RG, Socci ND, DeMatteo RP, Besmer P. Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by *KIT* genotype and anatomic site. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3282–3290
- Antonescu CR, Besmer P, Guo T, Arkun K, Horn G, Koryotowski B, Leversha MA, Jeffrey PD, Desantis D, Singer S, Brennan MF, Maki RG, DeMatteo RP. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4182–4190
- Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection of the *KIT* gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol* 1998; 29: 498–504
- Azam M, Latek RR, Daley GQ. Mechanisms of autoinhibition and STI571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 2003; 112: 831–843
- Beadling C, Patterson J, Justusson E, Nelson D, Pantaleo MA, Hornick JL, Chacón M, Corless CL, Heinrich MC. Gene expression of the IGF pathway family distinguishes subsets of gastrointestinal stromal tumors wild type for KIT and PDGFRA. *Cancer Med* 2013; 2: 21–31
- Bednarski BK, Araujo DM, Yi M, Torres KE, Lazar A, Trent JC, Comier JN, Pisters PW, Lev DC, Pollock RE, Feig BW, Hunt KK. Analysis of prognostic factors impacting oncologic outcomes after neoadjuvant tyrosine kinase inhibitor therapy for Gastrointestinal Stromal Tumors. *Ann Surg Oncol* 2014; 8: 2499–2505

Beghini A, Tibiletti MG, Roversi G, Chiaravalli AM, Serio G, Capella C, Larizza L. Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer* 2001; 92: 657–662

Belinsky MG, Rink L, Flieder DB, Jahromi MS, Schiffman JD, Godwin AK, Mehren Mv. Overexpression of insulin-like growth factor 1 receptor and frequent mutational inactivation of SDHA in wild-type SDHB-negative gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; 52: 214–224

Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, Ryan CW, von Mehren M, Benjamin RS, Raymond AK, Bramwell VH, Baker LH, Maki RG, Tanaka M, Hecht JR, Heinrich MC, Fletcher CD, Crowley JJ, Borden EC. Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J Clin Oncol* 2008; 26: 626–632

Bokemeyer C, Kuczyk MA, Dunn T, Serth J, Hartmann K, Jonasson J, Pietsch T, Jonas U, Schmoll HJ. Expression of stem-cell factor and its receptor *KIT* protein in normal testicular tissue and malignant germ-cell tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 301–306

Braconi C, Bracci R, Bearzi I, Bianchi F, Sabato S, Mandolesi A, Belvederesi L, Cascinu S, Valeri N, Cellerino R. Insulin-like growth factor (IGF) 1 and 2 help to predict disease outcome in GIST patients. *Ann Oncol* 2008; 19: 1293–1298

Burger H, den Bakker MA, Stoter G, Verweij J, Nooter K. Lack of c-kit exon 11 activating mutations in c-KIT/CD117-positive SCLC tumour specimens. *Eur J Cancer* 2003; 39: 793–799

Caram MV, Schuetze S. Advanced or metastatic gastrointestinal stromal tumors: Specific treatment options. *J Surg Oncol* 2011; 104: 888–895

Carney J, Stratakis C. Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad. *Am J Med Gen* 2002; 108: 132–139

Casali PG, Fumagalli E, Gronchi A. Adjuvant therapy of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Curr Treat Options Oncol* 2012; 13: 277–284

Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A. The proto-oncogene *KIT* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature* 1988; 335: 88–89

Chen LL, Trent JC, Wu EF, Fuller GN, Ramdas L, Zhang W, Raymond AK, Prieto VG, Oyediji CO, Hunt KK, Pollock RE, Feig BW, Hayes KJ, Choi H, Macapinlac HA, Hittelman W, Velasco MA, Patel S, Burgess MA, Benjamin RS, Frazier ML. A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 5913–5919

Cil T, Gokalp D, Onat S, Isikdogan A. Atypical Metastases of the Gastrointestinal Stromal Sarcoma. *Gastrointest Cancer Res* 2011; 4: 72–74

Corless CL, Mc Greevy L, Haley A, Town A, Heinrich MC. KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am J Pathol* 2002; 160: 1567–1572

Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 865–878

Corless CL. Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now? *Mod Pathol*. 2014; Suppl 1: S1–16

D' Auriol L, Mattei MG, Andre C, Galibert F. Localization of the human c kit proto oncogene on the q11-q12 region of chromosome 4. *Hum Genet* 1988; 78: 374–376

Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranck H, Scurr M, Hagemeijer A, van Glabbeke M, van Oosterom AT; EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. Use of *KIT/PDGFR* mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2004; 40: 689–695

Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, Sciot R, Stul M, Mentens N, Vranckx H, Wasag B, Prenen H, Roesel J, Hagemeijer A, Van Oosterom A, Marynen P. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against Imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* 2005; 128: 270–279

Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, Schlemmer M, Hohenberger P, van Oosterom AT, Blay JY, Leyvraz S, Stul M, Casali PG, Zalcberg J, Verweij J, Van Glabbeke M, Hagemeijer A, Judson I; EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group; Italian Sarcoma Group; Australasian Gastrointestinal Trials Group. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1093–1103

DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors of survival. *Ann Surg* 2000; 231: 51–58

DeMatteo RP, Ballman KV, Antonescu CR, Maki RG, Pisters PW, Demetri GD, Blackstein ME, Blanke CD, von Mehren M, Brennan MF, Patel S, McCarter MD, Polikoff JA, Tan BR, Owzar K; American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Intergroup Adjuvant GIST Study Team. Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009; 373: 1097–1104

Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347: 472–480

Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM, Casali PG. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 368: 1329–1338

Demetri GD, Wang Y, Wehrle E, Racine A, Nikolova Z, Blanke CD, Joensuu H, von Mehren M. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3141–3147

Demetri GD, Reichardt P, Kang Y-K, Blay J-Y, Rutkowski P, Gelderblom H, Hohenberger P, Leahy M, von Mehren M, Joensuu H, Badalamenti G, Blackstein M, Le Cesne A, Schöffski P, Maki RG, Bauer S, Nguyen BB, Xu J, Nishida T, Chung J, Kappeler C, Kuss I, Laurent D, Casali PG; GRID study investigators. Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013; 381: 295–302

Desai J, Shankar S, Heinrich MC, Fletcher JA, Fletcher CD, Manola J, Morgan JA, Corless CL, George S, Tuncali K, Silverman SG, Van den Abbeele AD, van Sonnenberg E, Demetri GD. Clonal evolution of resistance to imatinib in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5398–5405

DeSilva CM, Reid R. Gastrointestinal Stroma Tumor: *KIT* mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib. *Pathol Oncol Res* 2003; 9:13–19

DeWitt J, Emerson RE, Sherman S, Al-Haddad M, McHenry L, Cote GA, Leblanc JK. Endoscopic ultrasound-guided Trucut biopsy of gastrointestinal mesenchymal tumor. *Surg Endosc* 2011; 25: 2192–2202

Dickson MA, Okuno SH, Keohan ML, Maki RG, D'Adamo DR, Akhurst TJ, Antonescu CR, Schwartz GK. Phase II study of the HSP90-inhibitor BII021 in gastrointestinal stromal tumors. *Ann Oncol* 2013; 24: 252–257

Duensing A, Medeiros F, McConarty B, Joseph NE, Panigrahy D, Singer S, Fletcher CD, Demetri GD, Fletcher JA. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Oncogene* 2004; 23: 3999–4006

Emory TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH, O'Leary TJ. Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors. Dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 82–87

ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25: iii21–26

Fletcher CD, Berman JJ, Corless CL, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459–465

Floris G, Wozniak A, Sciort R, Li H, Friedman L, Van Looy T, Wellens J, Vermaelen P, Deroose CM, Fletcher JA, Debiec-Rychter M, Schöffski P. A potent combination of the novel PI3K Inhibitor, GDC-0941, with imatinib in gastrointestinal stromal tumor xenografts: long-lasting responses after treatment withdrawal. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 620–630

Frankel T, Chang AE, Wong SL. Surgical options for Localized and Advanced Gastrointestinal Stromal Tumor. *J Surg Oncol* 2011; 104: 882–887

Ginori A, Scaramuzzino F, Marsili S, Tripodi S. Late hepatic metastasis from a duodenal gastrointestinal stromal tumor (29 years after surgery): report of a case and review of the literature. *Int J Surg Pathol* 2015; 23: 317–321

Gleeson FC, Kipp BR, Kerr SE, Voss JS, Graham RP, Campion MB, Minot DM, Tu ZJ, Klee EW, Lazaridis KN, Henry MR, Levy MJ. Kinase genotype analysis of gastric gastrointestinal stromal tumor cytology samples using targeted next-generation sequencing. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 202–206

Gold JS, Gönen M, Gutiérrez A, Broto JM, García-del-Muro X, Smyrk TC, Maki RG, Singer S, Brennan MF, Antonescu CR, Donohue JH, DeMatteo RP. Development and validation of a prognostic nomogram for recurrence-free survival after complete surgical resection of localised primary gastrointestinal stromal tumour: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2009; 10: 1045–1052

González-Cámpora R, Delgado MD, Amate AH, Gallardo SP, León MS, Beltrán AL. Old and new immunohistochemical markers for the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 2011; 33: 1–11

Gounder MM, Maki RG. Molecular basis for primary and secondary tyrosine kinase inhibitor resistance in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011; 67 Suppl 1: 25–43

Gregory, Linda. Resistenzmechanismen von gastrointestinalen Stromatumoren unter Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren; biologische Diplomarbeit vorgelegt im März 2006, Referent: Prof. Dr. Reinhard Büttner; Korreferent: Prof. Dr. Volker Herzog, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Gramza AW, Corless CL, Heinrich MC. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res.* 2009 Dec 15; 15: 7510–7518

Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, Baldus SE, Heinicke T, Thiele J, Buettner R, Longley BJ. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumor and mastocytosis. *Gastroenterology* 2005; 129: 1042–1046

Hassan I, You YN, Shyyan R, Dozois EJ, Smyrk TC, Okuno SH, Schleck CD, Hodge DO, Donohue JH. Surgically managed gastrointestinal stromal tumors: a comparative and prognostic analysis. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 52–59.

Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4342–4349

Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, Eisenberg BL, von Mehren M, Fletcher CD, Sandau K, McDougall K, Ou WB, Chen CJ, Fletcher JA. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4764–4774

Heinrich MC, Maki R, Corless C, Antonescu C, Harlow A, Griffith D, Town A, McKinley A, Ou WB, Fletcher JA, Fletcher CD, Huang X, Cohen DP, Baum CM, Demetri GD. Primary and Secondary Kinase Genotypes Correlate with the Biological and Clinical Activity of Sunitinib in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5352–5359

Heydt C, Kumm N, Fassunke J, Künstlinger H, Ihle MA, Scheel A, Schildhaus HU, Haller F, Büttner R, Odenthal M, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S. Massively parallel sequencing fails to detect minor resistant subclones in tissue samples prior to tyrosine kinase inhibitor therapy. *BMC Cancer* 2015; 15: 291

Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of *KIT* in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279: 577–580

Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Müller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NC, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2190–2196

Hohenberger P, Ronellenfitsch U, Oladeji O, Pink D, Ströbel P, Wardelmann E, Reichardt P. Pattern of recurrence in patients with ruptured primary gastrointestinal stromal tumour. *Br J Surg* 2010; 97:1854–1859

Horie K, Fujita J, Takakura K, Kanzaki H, Suginami H, Iwai M, Nakayama H, Mori T. The expression of *KIT* protein in human adult and fetal tissues. *Hum Reprod* 1993; 8: 1955–1962
Hostein I, Longy M, Gastaldello B, Geneste G, Coindre JM. Detection of a new mutation in *KIT* exon 9 in a gastrointestinal stromal tumor. *Int J Cancer*. 2006; 118: 2089–2091

Huss S, Kunstlinger H, Wardelmann E, Kleine MA, Binot E, Merkelbach-Bruse S, Rüdiger T, Mittler J, Hartmann W, Büttner R, Schildhaus HU. A subset of gastrointestinal stromal tumors previously regarded as wild-type tumors carries somatic activating mutations in *KIT* exon 8 (p.D419del). *Mod Pathol* 2013; 26: 1004–1012

Huss S, Elges S, Trautmann M, Sperveslage J, Hartmann W, Wardelmann E. Classification of *KIT*/*PDGFRA* wild-type gastrointestinal stromal tumors: implications for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2015; 15: 623–628

Isozaki K, Terris B, Belghiti J, Schiffmann S, Hirota S, Vanderwinden JM. Germline-activating mutation in the kinase domain of *KIT* gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000; 157: 1581–1582

Janeway KA, Kim SY, Lodish M, Nosé V, Rustin P, Gaal J, Dahia PL, Liegl B, Ball ER, Raygada M, Lai AH, Kelly L, Hornick JL; NIH Pediatric and Wild-Type GIST Clinic, O'Sullivan M, de Krijger RR, Dinjens WN, Demetri GD, Antonescu CR, Fletcher JA, Helman L, Stratakis CA. Defects in succinate dehydrogenase in GIST lacking *KIT* and *PDGFRA* mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 314–318

Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LJ, Tervahartiala P, Tuveson DA, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri GD. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001; 344: 1052–1056

Joensuu H, Fletcher C, Dimitrijevic S, Silberman S, Roberts P, Demetri G. Management of malignant gastrointestinal stromal tumours. *Lancet Oncol* 2002; 3: 655–664

Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol* 2008; 39: 1411–1419

Joensuu H, Trent JC, Reichardt P. Practical management of tyrosine kinase inhibitor-associated side effects in GIST. *Cancer Treat Rev* 2011; 37: 75–88

Joensuu H, Eriksson M, Sundby Hall K, Hartmann JT, Pink D, Schütte J, Ramadori G, Hohenberger P, Duyster J, Al-Batran SE, Schlemmer M, Bauer S, Wardelmann E, Sarlomo-Rikala M, Nilsson B, Sihto H, Monge OR, Bono P, Kallio R, Vehtari A, Leinonen M, Alvegård T, Reichardt P. One vs three years of adjuvant imatinib for operable gastrointestinal stromal tumor: a randomized trial. *JAMA* 2012; 307: 1265–1272 (a)

Joensuu H, Vehtari A, Riihimäki J, Nishida T, Steigen SE, Brabec P, Plank L, Nilsson B, Cirilli C, Braconi C, Bordoni A, Magnusson MK, Linke Z, Suflarsky J, Federico M, Jonasson JG, Dei Tos AP, Rutkowski P. Risk of recurrence of gastrointestinal stromal tumour after surgery: an analysis of pooled population-based cohorts. *Lancet Oncol* 2012; 13: 265–274 (b)

Joensuu H, Eriksson M, Sundby Hall K, Reichardt A, Hartmann JT, Pink D, Ramadori G, Hohenberger P, Al-Batran SE, Schlemmer M, Bauer S, Wardelmann E, Nilsson B, Sihto H, Bono P, Kallio R, Junnila J, Alvegård T, Reichardt P. Adjuvant Imatinib for High-Risk GI Stromal Tumor: Analysis of a Randomized Trial. *J Clin Oncol* 2016; 34: 244–250

Jones DH, Caracciolo JT, Hodul PJ, Strosberg JR, Coppola D, Bui MM. Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: report of 2 cases with KIT exon 11 mutation. *Cancer Control* 2015; 22: 102–108

Kang YK, Ryu MH, Ryoo BY, Kim HJ, Lee JJ, Yoo C, Nam BH, Ramaiya N, Jagannathan JP, Demetri GD. Randomized phase III trial of imatinib (IM) rechallenge versus placebo (PL) in patients (pts) with metastatic and/or unresectable gastrointestinal stromal tumor (GIST) after failure of at least both IM and sunitinib (SU): RIGHT study. *J Clin Oncol.*, 2013 ASCO Annual Meeting Abstracts Vol 31, No 18 suppl, 2013: LBA10502

Kim E, Zalupki M. Systemic Therapy for Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors: Beyond Imatinib. *J Surg Oncol* 2011; 104: 901–906

Kleinbaum EP, Lazar AJ, Tamborini E, Mcauliffe JC, Sylvestre PB, Sunnenberg TD, Strong L, Chen LL, Choi H, Benjamin RS, Zhang W, Trent JC. Clinical, histopathologic, molecular and therapeutic findings in a large kindred with gastrointestinal stromal tumor. *Int J Cancer* 2008; 122: 711–718

Krystal GW, Hines SJ, Organ CP. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of *KIT* and stem-cell factor. *Cancer Res* 1996; 56: 370–376

Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Stachura T, Schneider-Stock R, Kallajoki M, Steigen SE, Sarlomo-Rikala M, Boltze C, Kordek R, Roessner A, Stachura J, Miettinen M. Gastrointestinal stromal tumors with internal tandem duplications in 3' end of KIT juxtamembrane domain occur predominantly in stomach and generally seem to have a favorable course. *Mod Pathol* 2003; 16: 1257–1264

Lasota J, Corless CL, Heinrich MC, Debiec-Rychter M, Sciort R, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Schildhaus HU, Steigen SE, Stachura J, Wozniak A, Antonescu C, Daum O, Martin J, Del Muro JG, Miettinen M. Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (*GIST*) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases. *Mod Pathol.* 2008; 21: 476–484

Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology.* 2008; 53: 245–266

Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. Correlation of imatinib resistance with the mutational status of KIT and PDGFRA genes in gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis. *J Gastrointest Liver Dis* 2013; 22: 413–418

Li FP, Fletcher JA, Heinrich MC, Garber JE, Sallan SE, Curiel-Lewandrowski C, Duensing A, van de Rijn M, Schnipper LE, Demetri GD. Familial Gastrointestinal Stroma Tumor Syndrome: Phenotypic and Molecular Features in a Kindred. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2735–2743

Liang J, Wu YL, Chen BJ, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int J Biol Sci* 2013 9: 435-443 (1)

Liang J-W, Zheng Z-C, Zhang J-J, Zhang T, Zhao Y, Yang W, Liu YQ. Laparoscopic versus open gastric resections for gastric gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2013; 23: 378–387 (2)

Liegl B, Kepten I, Le C, Zhu M, Demetri GD, Heinrich MC, Fletcher CD, Corless CL, Fletcher JA. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol* 2008; 216: 64–74

Liegl B, Hornick JL, Corless CL, Fletcher CD. Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 437–446

López V, Jordá E. Piebaldism in a 2-year-old girl. *Dermatol Online J* 2011; 17: 13

Lu HY, Zhang G, Cheng QY, Chen B, Cai JF, Wang XJ, Zhang YP, Wang Z, Lu ZY, Xie FJ, Mao WM. Expression and mutation of the c-kit gene and correlation with prognosis of small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2012; 4: 89–93

Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen C-J, Maclure T, Demetri G, Xiao S, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000; 156: 791–795

Mahadevan D, Cooke L, Riley C, Swart R, Simons B, Della Croce K, Wisner L, Iorio M, Shakalya K, Garewal H, Nagle R, Bearss D. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 2007; 26: 3909–3919

Marrari A, Trent JC, George S. Personalized cancer therapy for gastrointestinal stromal tumor: synergizing tumor genotyping with imatinib plasma levels. *Curr Opin Oncol* 2010; 22: 336–341

Marrari A, Wagner AJ, Hornick JL. Predictors of response to targeted therapies for gastrointestinal stromal tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 483–489

Martin J, Poveda A, Llombart-Bosch A, Ramos R, López-Guerrero JA, Garcia del Muro J, Maurel J, Calabuig S, Gutierrez A, González de Sande JL, Martínez J, De Juan A, Laínez N, Losa F, Alija V, Escudero P, Casado A, García P, Blanco R, Buesa JM; Spanish Group for Sarcoma Research. Deletions affecting codons 557-558 of the *KIT* gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 2005; 23: 6190–6198

Mechtersheimer G, Egerer G, Hensel M, Rieker RJ, Libicher M, Lehnert T, Penzel R. Gastrointestinal stromal tumours and their response to treatment with the tyrosine kinase inhibitor imatinib. *Virchows Arch* 2004; 444: 108–118

Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 327–337

Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors – definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001; 438: 1–12

Miettinen M, Lasota J, Sobin LH. Gastrointestinal Stroma Tumors of the Stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1373–1381 (a)

Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 52–68 (b)

Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: Pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 70–83

Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 1401–1408

Miettinen M, Lasota J. Histopathology of Gastrointestinal Stromal Tumor. *J Surg Oncol* 2011; 104: 865–873

Miettinen M, Wang ZF, Sarlomo-Rikala M, Osuch C, Rutkowski P, Lasota J. Succinate dehydrogenase-deficient GIST: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 66 gastric *GIST* with predilection to young age. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 1712–1721

Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterol Clin North Am* 2013; 42: 399–415

Nannini M, Astolfi A, Paterini P, Urbini M, Santini D, Catena F, Indio V, Casadio R, Pinna AD, Biasco G, Pantaleo MA. Expression of IGF-1 receptor in KIT/PDGF receptor- α wild-type gastrointestinal stromal tumors with succinate dehydrogenase complex dysfunction. *Future Oncol* 2013; 9: 121–126

Naoe H, Kaku E, Ido Y, Gushima R, Maki Y, Saito H, Yokote S, Gushima R, Nonaka K, Hoshida Y, Murao T, Ozaki T, Yokomine K, Tanaka H, Nagahama H, Sakurai K, Tanaka M, Iyama K, Baba H, Sasaki Y. Brain Metastasis from Gastrointestinal Stromal Tumor: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Gastroenterol* 2011; 5: 583–589

Nilsson B, Bümming P, Meis-Kindblom JM, Odén A, Dortok A, Gustavsson B, Sablinska K, Kindblom LG. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era - a population-based study in western Sweden. *Cancer* 2005; 103: 821–829

Nishida T, Kanda T, Nishitani A, Takahashi T, Nakajima K, Ishikawa T, Hirota S. Secondary mutations in the kinase domain of the KIT gene are predominant in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Sci* 2008; 99: 799–804

Pasini B, McWhinney S, Bei T, Matyakhina L, Stergiopoulos S, Muchow M, Boikos S, Ferrando B, Pacak K, Assie G, Baudin E, Chompret A, Ellison J, Briere J, Rustin P, Gimenez-Roqueplo A, Eng C, Carney J, Stratakis C. Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 79–88

Pelletier JS, Gill RS, Gazala S, Karmali S. A Systematic Review and Meta-Analysis of Open vs. Laparoscopic Resection of Gastric Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Clin Med Res* 2015; 7: 289–296

Pietsch T, Nicotra MR, Fraioli R, Wolf HK, Mottolese M, Natali PG. Expression of the *KIT* receptor and its ligand SCF in non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 75: 171–175

Reddy EP, Aggarwal AK. The Ins and Outs of Bcr-Abl Inhibition. *Genes Cancer* 2012; 3: 447–454

Reichardt P, Blay J-Y, Boukovinas I, Brodowicz T, Broto JM, Casali PG, Decatris M, Eriksson M, Gelderblom H, Kosmidis P, Le Cesne A, Pousa AL, Schlemmer M, Verweij J, Joensuu H. Adjuvant therapy in primary GIST: state-of-the-art. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 2012; 23: 2776–2781

Rossi S, Miceli R, Messerini L, Bearzi I, Mazzoleni G, Capella C, Arrigoni G, Sonzogni A, Sidoni A, Toffolatti L, Laurino L, Mariani L, Vinaccia V, Gnocchi C, Gronchi A, Casali PG, Dei Tos AP. Natural history of imatinib-naïve *GIST*: a retrospective analysis of 929 cases with long-term follow-up and development of a survival nomogram based on mitotic index and size as continuous variables. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 1646–1656

Sakurama K, Noma K, Takaoka M, Tomono Y, Watanabe N, Hatakeyama S, Ohmori O, Hirota S, Motoki T, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Haisa M, Matsuoka J, Tanaka N, Naomoto Y. Inhibition of focal adhesion kinase as a potential therapeutic strategy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 127–134

Scheijen B, Griffin JD. Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 2002; 21: 3314–3333

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of Abelson tyrosine kinase. *Science* 2000; 289: 1938–1942

Serrano C, George 2. Recent advances in the treatment of gastrointestinal stromal tumors. *Ther Adv Med Oncol* 2014; 6: 115–127

Shabahang M, Livingstone AS. Cutaneous metastases from a gastrointestinal stromal tumor of the stomach: review of literature. *Dig Surg* 2002; 19: 64–65

Singer S, Rubin BP, Lux ML, Chen CJ, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. Prognostic value of Kit mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3898–3905

Spritz RA, Giebel LB, Homes SA. Dominant negative and loss of function mutations of the *KIT* (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene in human piebaldism. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 261–269

Tamborini E, Bonadiman I, Greco A, Albertini V, Negri T, Gronchi A, Bertulli R, Colecchia M, Casali PG, Pierotti MA, Pilotti S. A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology* 2004; 127: 294–299

Tian Q, Frierson HF, Krystal GW, Moskaluk CA. Activating *KIT* gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol* 1999; 154: 1643–1647

Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K, Igarashi S, Shimamura K, Fukuda T, Suzuki T, Seito T. Preferential localization of *KIT* product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung cancer and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 1994; 424: 135–141

Vander Noot MR 3rd, Eloubeidi MA, Chen VK, Eltoum I, Jhala D, Jhala N, Syed S, Chieng DC. Diagnosis of gastrointestinal tract lesions by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy. *Cancer* 2004; 102: 157–163

Wagner AJ, Morgan JA, Chugh R, Rosen LS, George S, Gordon MS, Devine CM, Van den Abbeele AD, Grayzel D, Demetri GD. Inhibition of heat shock protein 90 (Hsp90) with the novel agent IPI-504 in metastatic GIST following failure of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) or other sarcomas: Clinical results from phase I trial. J Clin Oncol 2008 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 26, No 15S, 2008: 10503

Wardelmann E, Losen I, Hans V, Neidt I, Speidel N, Bierhoff E, Heinicke T, Pietsch T, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the *KIT* protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. Int J Cancer 2003; 106: 887–895

Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Thomas N, Schildhaus HU, Heinicke T, Speidel N, Pietsch T, Büttner R, Pink D, Reichardt P, Hohenberger P. Polyclonal evolution of multiple secondary *KIT* mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. Clin Cancer Res 2006; 12: 1743–1749

Wardelmann E, Thomas N, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Speidel N, Büttner R, Bihl H, Leutner CC, Heinicke T, Hohenberger P. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors caused by multiple *KIT* mutations. Lancet Oncol 2005; 6: 249–251

Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, Dimitrijevic S, Kononen J, Lugli A, Simon R, Sauter G. Prevalence of KIT expression in human tumors. J Clin Oncol 2004; 22: 4514–4522

West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, van de Rijn M. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. Am J Pathol 2004; 165: 107–113

Yoo C, Ryu MH, Kang BW, Yoon SK, Ryoo BY, Chang HM, Lee JL, Beck MY, Kim TW, Kang YK. Cross-sectional study of imatinib plasma trough levels in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors: impact of gastrointestinal resection on exposure to imatinib. J Clin Oncol 2010; 28: 1554–1559

Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. Cell 2007; 130: 323–334

Zhang L, Smyrk T, Young WJ, Stratakis C, Carney J. Gastric stromal tumors in Carney triad are different clinically, pathologically, and behaviorally from sporadic gastric gastrointestinal stromal tumors: findings in 104 cases. Am J Surg Pathol 2010; 34: 53–64

8. Danksagung

Bedanken möchte ich mich vor allem bei Frau Prof. Dr. med. E. Wardelmann für die Möglichkeit, über dieses Thema zu promovieren und für ihre Unterstützung, nicht zuletzt beim „Zusammenschreiben“ dieser Arbeit. In der Zeit im Labor wurde ich von Frau PD Dr. rer. nat. Sabine Merkelbach-Bruse und dem Team der medizinisch technischen Assistenten, insbesondere Frau Inge Losen, Ellen Paggen und Theresa Buhl tatkräftig unterstützt, auch hierfür danke ich sehr.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Sebastian Huss und seiner Familie, die mit einem stetig offenen Ohr, einem gastfreundlichen Haus, viel Zeit und außerordentlicher Geduld massgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Melanie Vanderhallen danke ich für die Unterstützung bei der Formatierung, Frau Suhre und Frau Cieslak aus dem Promotionsbüro Bonn für schnelle und unkomplizierte Hilfe gegen Ende der Fertigstellung.

Nicht zuletzt danke ich herzlich meiner Familie, die mir zum einen das Studium ermöglichte und zum anderen die nötigen Freiräume einräumte.